

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ROBSON CARLOS ALNOCH

IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA LIPASE OBTIDA POR
PROSPECÇÃO METAGENÔMICA

CURITIBA

2013

ROBSON CARLOS ALNOCH

IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA LIPASE OBTIDA POR
PROSPECÇÃO METAGENÔMICA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências - Bioquímica.

Orientador: Prof. Dra. Nadia Krieger

CURITIBA

2013

TERMO DE APROVAÇÃO

ROBSON CARLOS ALNOCH

IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA NOVA LIPASE OBTIDA POR PROSPECÇÃO METAGENÔMICA

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:


Prof.^a Dr.^a Nadia Krieger (Orientadora)
Departamento de Química – UFPR


Prof.^a Dr.^a Maria Luiza Fernandes Rodrigues
Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde – UTP


Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR

Curitiba, 18 de fevereiro de 2013

AGRADECIMENTOS

À professora Nadia Krieger pela oportunidade de realizar esse trabalho, pela orientação, pela paciência e por todo o conhecimento transmitido.

Ao professor Marcelo Müller pela avaliação do projeto e por toda ajuda e orientação durante a execução do projeto.

Aos professores Emanuel M. de Souza e David A. Mitchel pelas sugestões e críticas que muito contribuíram para esse trabalho.

Ao professor Leandro Piovan pela atenção, orientação, paciência e a valiosa colaboração neste trabalho.

À professora Viviane Martini pela amizade, confiança e pela oportunidade de trabalhar nesse projeto, além de todo ensinamento, paciência e disposição que teve comigo no início do trabalho.

À doutoranda Aline Dutra por todo ensinamento, paciência e pela disposição em ajudar sempre que precisei durante a realização do trabalho.

Aos colegas e amigos do LTEB, Kátia, Christiane, Rodriguinho, Edgar, Alessandra Biz, Daniele, Maura, Fernanda, Jonas, Maritza, Mirian, Michelle, Andrei, Alexandre e Fernanda. A Dini pela por todo ensinamento e “orientação” durante meu estágio, além das broncas e puxões de orelha. A Vanda por toda força e ajuda ao longo desses anos, além dos chás regados de muito açúcar antes das apresentações.

À Thamiris, aluna de iniciação por toda dedicação, ajuda e comprometimento, contribuindo muito nesse trabalho.

Ao Núcleo de Fixação de Nitrogênio, em especial ao pessoal do Laboratório Anexo, Sarah, Tuca, Adriano e Thalita, por todo ensinamento e ajuda ao longo de todo o trabalho.

Aos Técnicos Valter Antônio e Roseli Prado por todo auxílio nas etapas de purificação da proteína, além de todo ensinamento e paciência.

À mestrande Allen Caroline e à aluna de IC Thalita pela síntese e caracterização dos compostos, e pelas valiosas contribuições no trabalho.

Ao professor Miguel Nosedá e a professora Sílvia Maria, coordenadores do curso de pós-graduação em Bioquímica, e a secretária Irene Luzia, por todo apoio e atenção em todas as solicitações.

À UFPR e ao departamento de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realizar o Mestrado.

Aos membros da Banca Examinadora, Maria Luiza Machado Fernandes e Marcelo Müller pelas valiosas contribuições ao trabalho.

Ao CNPQ e CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao NPDEAS por todo suporte na realização do trabalho.

À Grazielle, meu amor, que esteve sempre ao meu lado, compartilhando os momentos difíceis e as alegrias. Pela sua paciência e apoio mesmo distante durante esses anos. Agradeço por todo amor e carinho que tem comigo, meu enorme reconhecimento e retribuição.

Aos meus queridos pais, àqueles que eu amo muito, e que sem eles eu nada seria: Seu Luiz e Dona Alice, que sempre acreditaram em mim, e que mesmo distantes sempre estiveram presentes em todos os momentos. Agradeço também aos meus irmãos Jackson e Anderson, por todo carinho, amizade e força nessa etapa tão especial da minha vida.

*“Tornamos nosso mundo significativo pela coragem
de nossas perguntas e pela profundidade
de nossas respostas.”*

Carl Sagan

RESUMO

Um nova lipase (LipC6G9) obtida por prospecção metagenômica foi imobilizada e seu potencial de aplicação em biocatálise foi avaliado. Três diferentes suportes com propriedades distintas em relação à forma de interação com a enzima (adsorção física e ligação covalente) foram comparados. Foram investigados os principais parâmetros do processo de imobilização: eficiência de imobilização (E), retenção de atividade (R) e atividade de esterificação da enzima imobilizada nos diferentes suportes. As eficiências de imobilização foram 100% em apenas 6 h para Immobead, 87% em 48 h para Accurel e 13% em 48 h para Celite. As atividades de hidrólise contra trioleína em *n*-heptano para LipC6G9 imobilizada em Accurel, Immobead e Celite foram de 160 U g⁻¹, 26 U g⁻¹ e 22 U g⁻¹, respectivamente. Entre os três preparados enzimáticos avaliados, apenas a lipase imobilizada em Accurel apresentou atividade de esterificação, com um valor de 16 U g⁻¹ na síntese de oleato de etila em *n*-heptano, com 90% de conversão em 8 h, a 40 °C. O suporte Accurel foi selecionado para a imobilização de LipC6G9 e sua posterior caracterização em meio orgânico. A enzima imobilizada manteve 100% de sua atividade residual após incubação a 30 °C e mais de 70% quando incubada a 40 °C e 50 °C, por 8 h em *n*-heptano. LipC6G9 imobilizada também se mostrou estável em diferentes solventes orgânicos como *n*-heptano (log P 4,0), *n*-hexano (log P 3,5), etanol (log P -0,23) e acetona (log P -0,31), mantendo mais de 80% de sua atividade residual após 8 h de incubação a 30 °C. A atividade de síntese de ésteres etílicos foi investigada com ácidos graxos de diferentes comprimentos de cadeia. Melhores conversões (90% em 3 h) foram obtidas para ácidos graxos saturados de cadeia média e longa (C8, C14 e C16), com máxima atividade (29 U g⁻¹) obtida para ácido palmítico (C16). Em relação à regiosseletividade, LipC6G9 foi caracterizada como uma lipase 1,3 específica. A enantioseletividade de LipC6G9 foi avaliada por meio de reações de transesterificação do álcool (R,S)-1-fenil-1-etanol com acetato de vinila e da hidrólise do éster análogo, (R,S)-acetato de 1-feniletila. Foram obtidos excelentes valores de excesso enantiomérico (ee >95%) e enantioseletividade (E > 200) para o isômero (R) de ambos os substratos avaliados. Os resultados reportados neste trabalho são promissores e fundamentam estudos futuros para o desenvolvimento de aplicações LipC6G9 imobilizada em Accurel em biocatálise.

Palavras-chave: lipases, metagenômica, imobilização, biocatálise.

ABSTRACT

A new lipase obtained by a metagenomic approach (LipC6G9) was immobilized and its potential for application in biocatalysis was evaluated. Three immobilization supports that interact differently with the enzyme (physical adsorption and covalent bonding) were compared. Key immobilization parameters were determined for each support: the immobilization efficiency (E), the activity retention (R) and the esterification activity of the immobilized enzyme. The immobilization efficiencies were 100% in only 6 h for Immobead, 87% in 48 h for Accurel and 13% in 48 h for Celite. The hydrolytic activities against triolein in *n*-heptane for LipC6G9 immobilized on Accurel, Immobead and Celite were 160 U g⁻¹, 26 U g⁻¹ and 22 U g⁻¹, respectively. Amongst the three preparations, only the lipase immobilized on Accurel showed esterification activity, with a value of 16 U g⁻¹ for the synthesis of ethyl oleate in *n*-heptane, giving a conversion of 90% in 8 h at 40 °C. The performance in organic media of LipC6G9 immobilized on Accurel was further investigated. After incubation in *n*-heptane for 8 h, LipC6G9 maintained 100% of its residual activity at 30 °C and more than 70% at 40 °C and 50 °C. It was also stable in organic solvents-such as *n*-heptane (log P 4.0), *n*-hexane (log P 3.5), ethanol (log P -0.23) and acetone (log P -0.31), maintaining more than 80% residual activity after 8 h incubation at 30 °C. The activity for the synthesis of ethyl esters was tested with fatty acids of different chains lengths. The best conversions (90% in 3 h) were obtained for medium and long chain saturated fatty acids (C8, C14 and C16), with the maximum activity (29 U g⁻¹) being obtained with palmitic acid (C16). With respect to regioselectivity, LipC6G9 was 1,3-specific. Enantioselectivity was tested using the transesterification of the alcohol (*R,S*)-1-phenylethanol with vinyl acetate and the hydrolysis of the analog ester, (*R,S*)-1-phenylethyl acetate. Excellent results were obtained for the enantiomeric excess (ee >95%) and enantioselectivity (E > 200) for the *R*-isomer of both substrates. The results obtained in this work are promising and provide the basis for the development of applications of LipC6G9, immobilized on Accurel, in biocatalysis.

Keywords: lipases, metagenomics, Immobilization, biocatalysis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REAÇÃO ENZIMÁTICA DE UMA LIPASE CATALISANDO A HIDRÓLISE OU A SÍNTESE DE UM TRIACILGLICEROL	17
FIGURA 2 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LIPASE DE <i>CANDIDA RUGOSA</i> , MOSTRANDO DE FORMA SOBREPOSTA DA “LID” NA CONFORMAÇÃO ABERTA E FECHADA.....	18
FIGURA 3 - MODELO ESTRUTURAL DE α/β HIDROLASES.....	19
FIGURA 4 - MECANISMO CATALÍTICO PROPOSTO PARA SERINA HIDROLASES	21
FIGURA 5 – REAÇÕES DE HIDRÓLISE DE TRIACILGLICERÓIS CATALISADAS POR LIPASES NÃO ESPECÍFICAS E 1,3 ESPECÍFICAS.....	22
FIGURA 6 - EXEMPLOS DE REAÇÕES DE RESOLUÇÃO CINÉTICA ENZIMÁTICA DE RACEMATOS CATALISADAS POR LIPASES.....	24
FIGURA 7 - MODELO ESTRUTURAL DO SÍTIO ATIVO DE LIPASES SEGUNDO A REGRA DE KAZLAUSKAS ET AL. (1991)	25
FIGURA 8 - GEL SDS-PAGE DA LIPASE LIPC6G9 COMPLEXADA À SUA FOLDASE LIFC6G9 APÓS A PURIFICAÇÃO	31
FIGURA 9 - IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES POR ADSORÇÃO FÍSICA EM SUPORTES HIDROFÓBICOS	39
FIGURA 10 - CONFORMAÇÕES DE LIPASES IMOBILIZADAS EM DIFERENTES SUPORTES.....	40
FIGURA 11 - PRINCIPAIS REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES	43
FIGURA 12 - ESTRATÉGIA GERAL DESTE TRABALHO	50
FIGURA 13 - ESTRATÉGIA DE AÇÃO DESENVOLVIDA POR MARTINI (2012) PARA OBTENÇÃO DA LIPASE LIPC6G9	52
FIGURA 14 - ESQUEMA GERAL DE SÍNTESE DOS SUBSTRATOS PARA A DETERMINAÇÃO DA ENANTIOSSELETIVIDADE DE LIPC6G9.....	60
FIGURA 15 - TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÁLCOOL 1-FENIL-1-ETANOL (2) CATALISADA PELA LIPASE LIPC6G9	61
FIGURA 16 - GEL SDS-PAGE DAS FRAÇÕES ELUÍDAS DURANTE PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DA LIPASE LIPC6G9.....	65

FIGURA 17 - CINÉTICA DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE LIPC6G9 EM TERMOS DE (A) ATIVIDADE RESIDUAL (U mL^{-1}) E (B) CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA NO SOBRENADANTE DA SOLUÇÃO OFERECIDA PARA IMOBILIZAÇÃO	68
FIGURA 18 - CINÉTICA DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADA POR DIFERENTES PREPARAÇÕES DA LIPASE LIPC6G9	73
FIGURA 19 - GEL DE ELETROFORESE SDS-PAGE MOSTRANDO AS BANDAS DE PROTEÍNAS CORRESPONDENTES À LIPC6G9 E LIPC6G9 ANTES E DEPOIS DA IMOBILIZAÇÃO E APÓS DESSORÇÃO DO COMPLEXO DO SUPORTE ACCUREL MP-1000.....	75
FIGURA 20 - ESTABILIDADE DE LIPC6G9 LIVRE E IMOBILIZADA EM DIFERENTES TEMPERATURAS	80
FIGURA 21 - CINÉTICA DE REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO MEDIADA PELA LIPASE LIPC6G9 IMOBILIZADA EM ACCUREL MP-1000.....	82
FIGURA 22 - ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DA LIPASE LIPC6G9 IMOBILIZADA EM ACCUREL MP-1000 CONTRA DIFERENTES ÁCIDOS GRAXOS.....	83
FIGURA 23 - DETERMINAÇÃO DA REGIOSSELETIVIDADE DE LIPC6G9 POR ANÁLISE DOS PRODUTOS DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DA TRIOLEÍNA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	85
FIGURA 24 - A) SEPARAÇÃO E CONFIRMAÇÃO DOS PADRÕES (R,S) 1-FENIL-1-ETANOL E 1-FENIL-1-ETANOILA POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA QUIRAL; B) RESOLUÇÃO CINÉTICA DO SUBSTRATO (R,S) 1-FENIL-1-ETANOL CATALISADA PELA LIPASE LIPC6G9 E C) PELA LIPASE <i>CANDIDA ANTARTICA</i> (CALB).....	87

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - EXEMPLOS DE LIPASES DE DIFERENTES FONTES CLASSIFICADAS EM RELAÇÃO À SUA REGIOSSELETIVIDADE	23
TABELA 2 - PROCESSOS INDUSTRIAIS DE INTERMEDIÁRIOS QUIRAIS CATALISADOS POR LIPASES	44
TABELA 3 - EXEMPLOS DE LIPASES IMOBILIZADAS EM SÍNTESE DE ÉSTERES.....	47
TABELA 4 - PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS SUPORTES EMPREGADOS PARA A IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE LIPC6G9.....	54
TABELA 5 - PURIFICAÇÃO DA LIPASE LIPC6G9 POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE	66
TABELA 6 - PRINCIPAIS PARÂMETROS DO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPC6G9 NOS DIFERENTES SUPORTES	69
TABELA 7 - ESTABILIDADE DE LIPC6G9 EM SOLVENTES ORGÂNICOS	77
TABELA 8 - RESOLUÇÃO DE (R,S) 1-FENIL-1-ETANOL E (R,S) ACETATO DE 1-FENILETILA UTILIZANDO A LIPASE LIPC6G9 IMOBILIZADA EM ACCUREL MP-1000	86

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

amp	-	Ampicilina
Ati	-	Atividade enzimática inicial
Atf	-	Atividade enzimática final
a_w	-	Atividade de água
CAL-B	-	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>
CCD	-	Cromatografia em camada delgada
CG	-	Cromatografia gasosa
DO ₆₀₀	-	Densidade óptica ($\lambda = 600$ nm)
E	-	Eficiência de imobilização
<i>E</i>	-	Razão enantiomérica
ee		Excesso enantiomérico
IPTG	-	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
KM		Canamicina
LB	-	Meio de cultivo Luria Bertani
<i>lifC6G9</i>	-	Gene da foldase C6G9
LifC6G9	-	Proteína foldase C6G9
<i>lipC6G9</i>	-	Gene da lipase C6G9
LipC6G9	-	Proteína lipase C6G9
log P	-	Logaritmo do coeficiente de partição num sistema bifásico padrão octanol/água
R	-	Retenção de atividade
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	-	Rotações por minuto
U	-	Unidades totais de atividade enzimática

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 LIPASES.....	17
2.1.1 Características Gerais	17
2.1.2 Especificidade de Lipases	20
2.1.3 Fontes de Lipases	27
2.1.4 Lipases Obtidas por Prospecção Metagenômica	28
2.1.4.1 Lipase LipC6G9.....	30
2.2 BIOCATÁLISE EM MEIOS NÃO-CONVENCIONAIS	32
2.2.1 A Influência do Solvente Orgânico	34
2.2.2 O Papel da Água	35
2.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	36
2.3.1 Métodos de Imobilização.....	37
2.3.2 Imobilização de Lipases	38
2.4 LIPASES IMOBILIZADAS EM BIOCATÁLISE	42
3. OBJETIVOS.....	49
3.1 OBJETIVO GERAL.....	49
3.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
3.1.2 ESTRATÉGIA DE AÇÃO.....	50
4. MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1 REAGENTES, MATERIAIS E MEIOS DE CULTIVO	51
4.2 LIPASE LIPC6G9	51
4.3 SUPEREXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA LIPASE LIPC6G9	52
4.4 ESTUDOS DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPC6G9	53
4.4.1 Seleção do Suporte	53
4.4.1.1 Imobilização em Accurel MP-1000	54
4.4.1.2 Imobilização em Celite-545	55
4.4.1.3 Imobilização em Immobead -150	55
4.4.1.4 Cinética de Imobilização.....	55
4.5 CARACTERIZAÇÃO DE LIPC6G9 IMOBILIZADA EM MEIO ORGÂNICO.....	56
4.5.1 Atividade de Hidrólise.....	56
4.5.2 Estabilidade em Solventes Orgânicos.....	57

4.5.2 Estabilidade à Temperatura	57
4.5.3 Atividade de Esterificação	58
4.5.4 Especificidade ao Substrato	58
4.5.5 Determinação da Regiosseletividade	59
4.5.6 ENSAIOS DE ENANTIOSSELETIVIDADE UTILIZANDO LIPC6G9.....	59
4.5.6.1 Síntese dos substratos	59
4.5.6.2 Resolução Cinética dos Substratos (<i>R,S</i>) 1-fenil-1-etanol e (<i>R,S</i>) acetato de 1-feniletila Utilizando LipC6G9 Imobilizada	60
4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS	62
4.6.1 Eletroforese SDS-PAGE.....	62
4.6.2 Determinação de Proteínas.....	63
4.6.3 Método Titulométrico (pH-Stat)	63
4.6.4 Método de Lowry-Tinsley	64
4.6.5 Cromatografia em Fase Gasosa em Coluna Quiral.....	64
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LIPASE LIPC6G9.....	65
5.2 ESTUDOS DE IMOBILIZAÇÃO	67
5.2.1 Seleção do Suporte para Imobilização	67
5.2.2 Cinética de Imobilização.....	67
5.2.3 Atividade de Esterificação de LipC6G9 Imobilizada em Diferentes Suportes.....	72
5.2.4 Verificação da Adsorção de LipC6G9 e de LipC6G9 no Suporte Accurel MP-1000	75
5.3 CARACTERIZAÇÃO DE LIPC6G9 IMOBILIZADA EM MEIO ORGÂNICO	76
5.3.1 Estabilidade em Solventes Orgânicos.....	76
5.3.2 Estabilidade à Temperatura	79
5.3.3 Especificidade ao Substrato	81
5.3.4 Determinação da Regiosseletividade	84
5.3.5 Determinação da Enantiosseletividade de LipC6G9 Frente a Álcoois Secundários	85
6 CONCLUSÕES	89
7. PERSPECTIVAS.....	90
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
9 ANEXOS	110

1. INTRODUÇÃO

Lipases (glicerol éster hidrolases EC 3.1.1.3) são enzimas que têm como função natural a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa, liberando di- ou monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol. Em adição à sua atividade de hidrólise, as lipases catalisam uma série de diferentes reações dependendo dos reagentes de partida empregados e do solvente utilizado (JAEGER et al., 1994). Muitas lipases são seletivas a seu substrato, apresentam propriedades de regio e enantiosseletividade, são estáveis em meios orgânicos e não dependem de cofatores (GUPTA et al., 2004; JAEGER et al., 1999). Essas características justificam a ampla aplicação de lipases em diferentes processos, tais como na formulação de detergentes, na degradação de óleos e gorduras, na síntese fármacos e cosméticos e na indústria de alimentos (HASAN et al., 2006; KRISHNA, 2002). Entretanto, ainda se faz necessário a busca de lipases para aplicação em processos biocatalíticos industriais, que na maioria das vezes são realizados condições que requerem atividade e estabilidade em ambientes reacionais não favoráveis à catálise enzimática.

Devido aos fatores citados acima, novas abordagens vêm sendo utilizadas com objetivo de identificar e selecionar novas lipases com alta atividade e estabilidade em meios não convencionais. Nos últimos anos, estratégias baseadas em biologia molecular e engenharia de proteínas têm sido empregadas com sucesso para encontrar ou criar o biocatalisador desejado (WAHAB et al., 2012; JAEGER et al., 2001). Dentre essas abordagens, a triagem em bibliotecas metagenômicas é uma alternativa eficiente para encontrar novos biocatalisadores de origem diversificada (GLOGAUER et al., 2011; LORENZ e ECK, 2005). A metagenômica envolve a coleta e análise de genomas de todos os micro-organismos presentes em um determinado ambiente (RONDON et al., 2000; HANDELSMAN et al., 1998). A partir disso, pode se ter acesso a uma riqueza de informações sobre novos genes e moléculas com aplicações biotecnológicas (LORENZ e ECK, 2005; STREIT e SCHMITZ, 2004).

Recentemente, novas lipases e esterases obtidas por metagenômica foram descritas (JIN et al., 2012; FAN et al., 2011; GLOGAUER et al., 2011; COTÉ e SHARECK, 2010), dentre elas, a lipase LipC6G9. Genes correspondentes a esta nova lipase e sua foldase foram identificados e sequenciados a partir de uma biblioteca metagenômica criada por Glogauer et al. (2011). A nova lipase foi clonada,

superexpressa e purificada por Martini (2012). Estudos de caracterização da lipase livre revelaram atividade e estabilidade em ampla faixa de pH (5,5 a 9,5) e temperatura (10 a 50 °C) quando incubada por 1,5 h e altas atividades contra substratos de cadeia média (tricaprilina, 1500 U mg⁻¹) e longa (trioleína, 820 U mg⁻¹), comparáveis às das lipases comerciais de *Rhizopus oryzae*, *Rhizomucor miehei* e *Thermomyces lanuginosus* (MARTINI, 2012). As características apresentadas sugeriram que LipC6G9 poderia ter um grande potencial para aplicações em biocatálise. Entretanto, para o desenvolvimento destas aplicações, é recomendável que a lipase esteja imobilizada, pois a imobilização da enzima pode assegurar vantagens que resultarão na diminuição do custo do processo, principalmente pela possibilidade de reutilização da enzima e pela facilidade de recuperação dos produtos, além de proporcionar mais atividade e estabilidade da enzima (MATEO et al., 2007; VILLENEUVE et al., 2000).

Nesse cenário, este trabalho teve como objetivo a imobilização e a caracterização de uma nova lipase (LipC6G9) obtida por prospecção metagenômica com vistas à sua aplicação em biocatálise. Foram avaliadas a atividade e estabilidade da enzima imobilizada em diferentes solventes orgânicos e seu potencial de aplicação na síntese de ésteres. Finalmente, foram determinadas propriedades de regio e enantiosseletividade de LipC6G9, características importantes para futuras aplicações industriais.

cobre o sítio catalítico deixando-o completamente isolado do meio de reação, sendo que, nesta conformação, a lipase se encontra na sua forma “fechada” e é inativa. Na presença de substratos hidrofóbicos em solução aquosa, as lipases são “adsorvidas” na interface hidrofóbica e a *lid* desloca-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, expondo o sítio ativo favorecendo a ligação com o substrato. Esta mudança na estrutura tridimensional da lipase em interfaces água/óleo é conhecida como ativação interfacial (JAEGER; DIJSTRA; REETZ, 1999; SCHRAG et al., 1997).

Em 1958, Sarda e Desnuelle (SARDA e DESNUELLE, 1958) definiram a ativação interfacial como uma característica cinética das lipases na presença de substratos insolúveis em água e emulsificados, ou seja, na presença de uma interface lipídio/água. Os autores concluíram que essa característica é exclusiva de lipases, enquanto que esterases (EC 3.1.1.1) atuam apenas em substratos solúveis. Entretanto, foram descritas lipases que não apresentam ativação interfacial, como por exemplo, as lipases de *Pseudomonas aeruginosa* e de *Burkholderia glumae*, que apresentam a *lid* em suas estruturas, mas não sofrem ativação interfacial (HASAN; SHAH; HAMEED, 2009; JAEGER; DIJSTRA; REETZ, 1999).

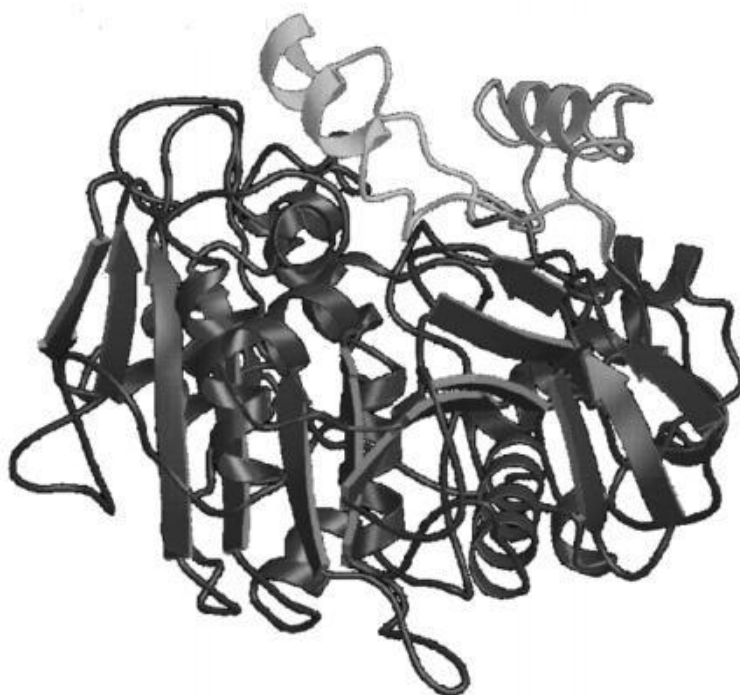


FIGURA 2 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DA LIPASE DE *Candida rugosa*, MOSTRANDO DE FORMA SOBREPOSTA A “LID” NA CONFORMAÇÃO ABERTA E FECHADA

Fonte: Grochulski et al. (1994).

Ferrato et al. (1997) mostraram que a presença da *lid* e a ativação interfacial não são características de todas as lipases e que essas características dependem da enzima e do substrato empregado e das condições experimentais. As cutinases, por exemplo, são enzimas que não possuem *lid* e não precisam da ativação interfacial para exibir atividade lipolítica (CYGLER e SCHRAG, 1997). Assim, a presença da *lid* e o fenômeno da ativação interfacial passaram a não ser critérios adequados para se classificar uma enzima como lipase. Nos trabalhos mais recentes, lipases têm sido definidas como carboxilesterases que atuam na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa (acima de dez átomos de carbono) (KAPOOR e GUPTA 2012; SHARMA, SHARMA, SHUKLA, 2011; CHEN et al., 2009; KIM et al., 2006; JAEGER; DIJSTRA; REETZ, 1999).

Em relação à estrutura, lipases apresentam como estrutura terciária comum uma dobra padrão do tipo α/β hidrolase. Este tipo de estrutura apresenta um núcleo central composto por fitas β paralelas, rodeado por porções α -hélice. As fitas β têm orientação para a esquerda, sendo que a primeira e a última fita possuem um ângulo de aproximadamente 90° entre si. O núcleo central das α/β hidrolases é composto por até oito fitas β paralelas rodeadas por até seis α -hélices (POUDEROYEN et al., 2001; JAEGER; DIJSTRA; REETZ, 1999).

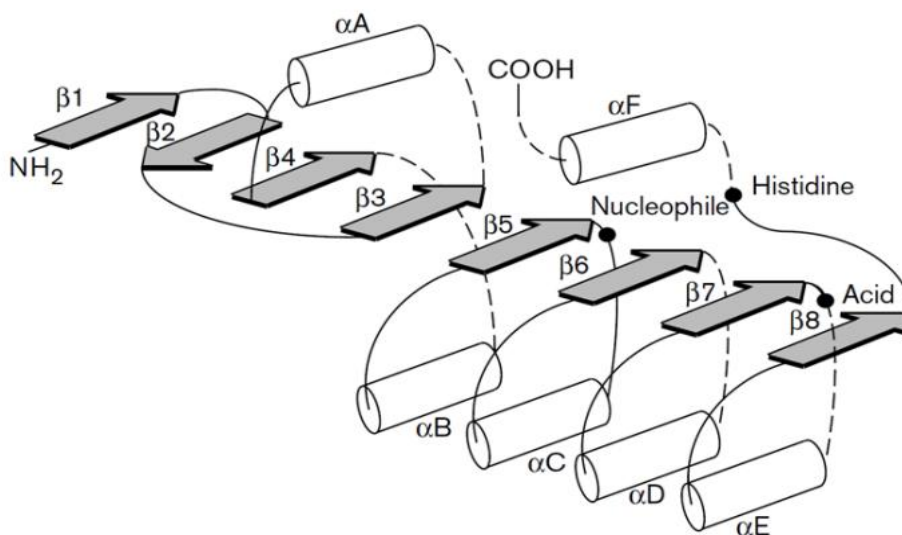


FIGURA 3 - MODELO ESTRUTURAL DE α/β HIDROLASES

As α -hélices são representadas pelos cilindros e as folhas β pelas setas planas. Os círculos sólidos em preto representam as posições topológicas dos resíduos que compõem o sítio ativo.

Fonte: Jaeger; Dijkstra; Reetz (1999).

O sítio ativo de lipases é formado por uma tríade catalítica constituída pelos aminoácidos serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina. Esse sítio catalítico localizado na extremidade C-terminal da fita $\beta 5$ faz parte de um pentapeptídeo altamente conservado GX SXG, onde G= glicina; S= Serina; X1= histidina e X2= ácido glutâmico ou aspártico. Variações dessa estrutura podem ser observadas em lipases de organismos do gênero *Bacillus* e incluem a substituição do primeiro resíduo de glicina por uma alanina (JAEGER; DIJSTRA; REETZ, 1999).

O mecanismo catalítico de hidrólise de triacilgliceróis por lipases segue o modelo proposto para a quimotripsina, uma serina protease, devido à semelhança estrutural entre o sítio de lipases e proteases (Figura 4) (JAEGER et al., 1994). A hidrólise ocorre em duas etapas: inicialmente, a disposição dos aminoácidos no sítio catalítico, em especial o resíduo de histidina presente na tampa hidrofóbica, promove uma diminuição no valor do pKa do grupo hidroxila do resíduo de serina, aumentando sua nucleofilicidade. Esse aumento permite que ocorra o ataque nucleofílico do oxigênio da hidroxila ao carbono carbonílico da ligação éster da cadeia do substrato, formando um intermediário tetraédrico. O anel imidazol da histidina fica protonado e carregado positivamente, sendo estabilizado pela carga negativa do resíduo ácido. O intermediário tetraédrico é estabilizado por duas ligações de hidrogênio formadas com os grupamentos amida entre os resíduos de aminoácidos específicos. Uma molécula de álcool é liberada, formando um complexo acil-enzima (etapa 1). Na segunda etapa, uma molécula de água atua como nucleófilo atacando o intermediário acil-enzima; o ácido graxo é liberado e a enzima é regenerada. Dependendo do meio reacional utilizado (aquoso ou orgânico) qualquer outro nucleófilo pode competir com a água pelo intermediário acil-enzima, conduzindo assim, a um número significativo de reações úteis em biocatálise (GHANEM, 2007; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; JAEGER et al., 1994).

2.1.2 Especificidade de Lipases

O grande potencial das lipases como biocatalisadores se deve principalmente à alta seletividade e especificidade frente a seus substratos, permitindo assim, um ajuste fino das reações que catalisam, evitando a formação de produtos indesejáveis.

Essa especificidade deve-se principalmente à orientação imposta pela dimensão e estrutura do sítio ativo em relação ao substrato, originando restrições que levam à distinção e à catálise seletiva de funções quimicamente similares na mesma molécula (FABER, 2000; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

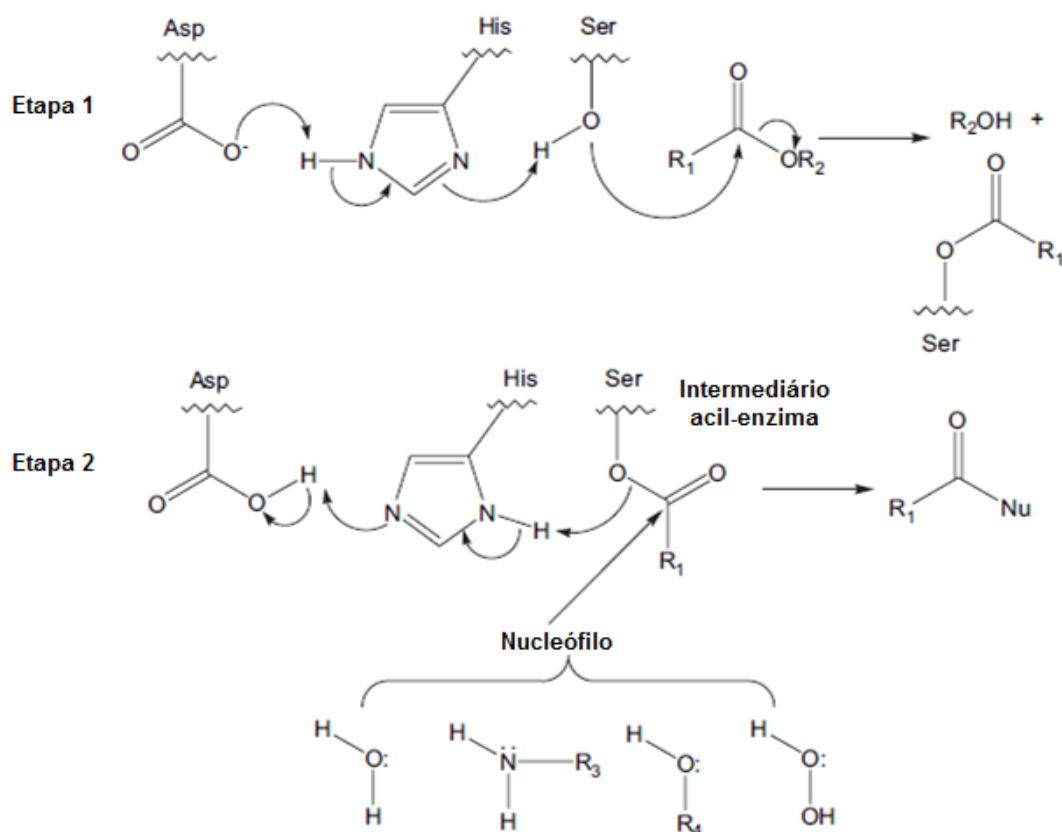


FIGURA 4 - MECANISMO CATALÍTICO PROPOSTO PARA SERINA HIDROLASES

Fonte: Adaptado de Ghanem, (2007).

Segundo Faber (2000), lipases podem ser classificadas em relação à seletividade, como quimiosseletivas, onde a enzima atua em um único tipo de grupo funcional na molécula de substrato; regiosseletivas, sendo estas capazes de distinguir entre grupos funcionais quimicamente idênticos localizados em diferentes posições na mesma molécula de substrato; estereosseletivas, com capacidade de reconhecer preferencialmente um isômero em relação ao outro em uma mistura racêmica.

Em relação à regiosseletividade, lipases podem ser classificadas em três diferentes grupos: lipases não específicas, que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis

de modo aleatório, produzindo ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários, a exemplo do que ocorre na catálise química; lipases 1,3 específicas, que são aquelas que hidrolisam a ligação éster especificamente nas posições *sn* 1 e *sn* 3 de triacilgliceróis e lipases 2-específicas, que hidrolisam a ligação éster especificamente nas posições *sn* 2 de triacilgliceróis, dando origem a produtos com composições diferentes daquelas obtidas pelas lipases não específicas (Figura 5) (SUGIHARA et al., 1992). A Tabela 1 apresenta alguns exemplos de lipases descritas em relação à sua regioseletividade.

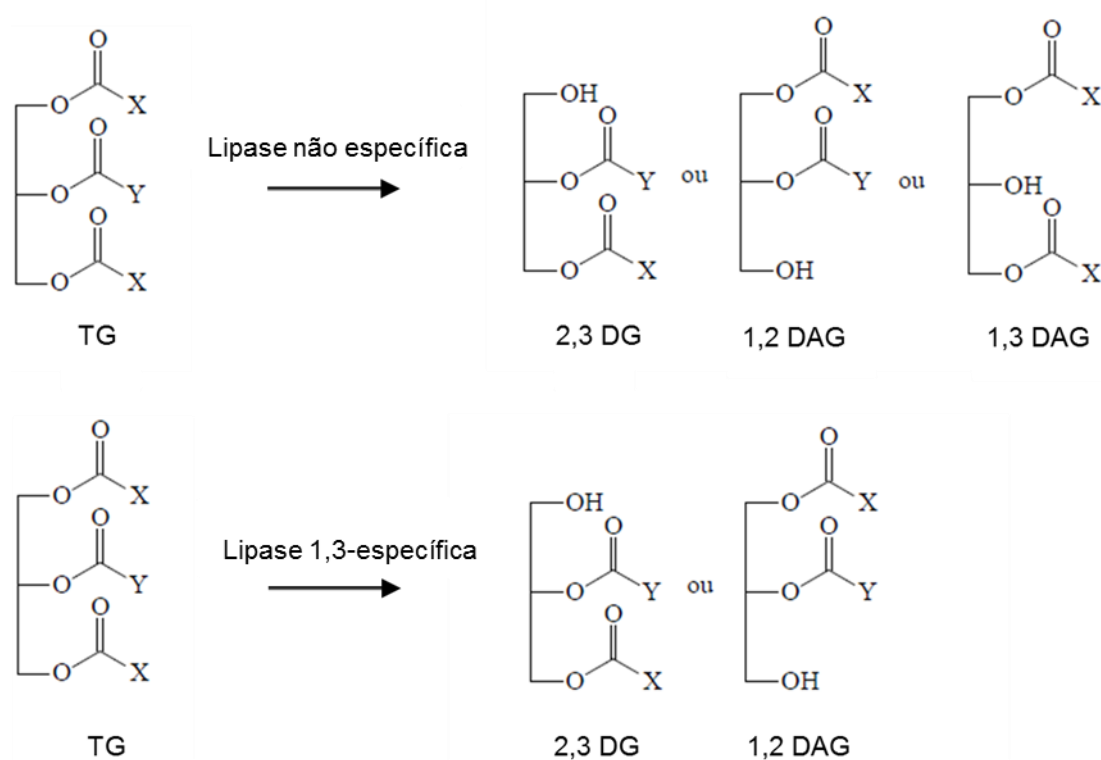


FIGURA 5 – REAÇÕES DE HIDRÓLISE DE TRIACILGLICERÓIS CATALISADAS POR LIPASES NÃO ESPECÍFICAS E 1,3 ESPECÍFICAS

Fonte: Adaptado de Paques e Macedo (2006).

As lipases ácido-graxo específicas ou tiposseletivas apresentam seletividade quanto ao tamanho da cadeia carbônica ou número de insaturações do grupo acila na molécula de substrato. Lipases com essa característica têm ação específica na hidrólise de ésteres, cujos ácidos graxos são de cadeia longa insaturada com duplas ligações, em *cis* em C-9 e C-10 (KAPOOR e GUPTA, 2012; WANG et al., 2008).

TABELA 1 - EXEMPLOS DE LIPASES DE DIFERENTES FONTES CLASSIFICADAS EM RELAÇÃO À SUA REGIOSSELETIVIDADE

	Origem	Especificidade	Referência
Fungos	<i>Aspergillus niger</i>	1,3-específica	Godfrey (1995)
	<i>Candida antarctica A</i>	2-específica	Krishna e Karanth (2002)
	<i>Candida antarctica B</i>	1,3-específica	Schmid et al. (1998)
	<i>Candida rugosa</i>	não específica	Godfrey (1995)
	<i>Mucor javanicus</i>	1,3-específica	Contesini et al. (2010)
	<i>Penicillium camembertii</i>	1,3-específica	Schmid et al. (1998)
	<i>Rhizopus delemar</i>	1,3-específica	Contesini et al. (2010)
	<i>Rhizomucor miehei</i>	1,3-específica	Godfrey (1995)
	<i>Rhizopus oryzae</i>	1,3-específica	Schmid et al. (1998)
	<i>Thermomyces lanuginosa</i>	1,3-específica	Fernandez-Lafuente (2010)
Bactéria	<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	1,3-específica	Krishna e Karanth (2002)
	<i>Burkholderia glumae</i>	não específica	Schmid et al. (1998)
	<i>Burkholderia cepacia</i>	não específica	Schmid et al. (1998)
	<i>Chromobacterium viscosum</i>	não específica	Godfrey (1995)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	não específica	Godfrey (1995)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	não específica	Gaur et al. (2008)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	não específica	Castro et al. (2004)
Animal	Pâncreas Suíno	1,3-específica	Schmid et al. (1998)
	Pâncreas Humano	1,3-específica	Schmid et al. (1998)

Lipases enantiosseletivas são muito atrativas em biocatálise, sendo amplamente utilizadas na resolução de racematos, visando à produção de compostos opticamente puros. A aplicação de lipases nessas reações é de grande importância, uma vez que enantiômeros possuem propriedades químicas semelhantes em um ambiente aquiral, o que dificulta sua separação química por métodos convencionais. (FABER, 2000).

A resolução cinética enzimática baseia-se na capacidade da enzima reagir com diferentes velocidades com os dois enantiômeros, com formação preferencial de um enantiômero em relação ao outro. Assim, se a interação de um enantiômero for muito mais favorável que a de seu antípoda, a velocidade de transformação do primeiro será tão alta que este será totalmente transformado no meio, enquanto o outro

ceparia frente a álcoois secundários com base no tamanho e na forma dos substratos quando estão no sítio ativo da enzima. A regra de Kazlauskas leva em consideração o volume dos substituintes ao redor do centro de quiralidade a ser resolvido, onde o grupo hidroxila é projetado para trás do plano (Figura 7).

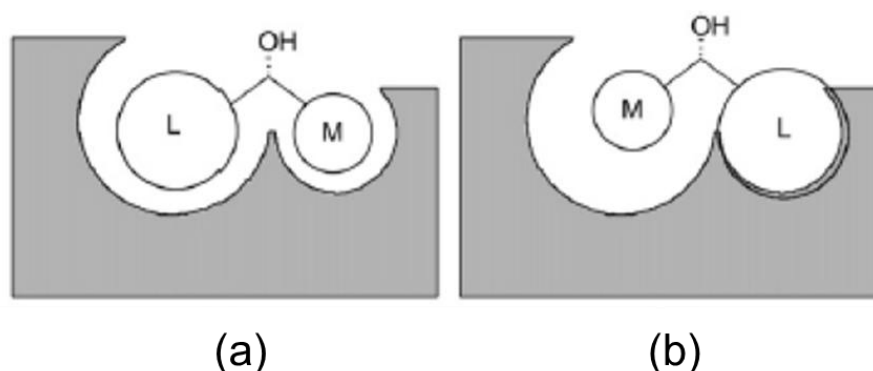


FIGURA 7 - MODELO ESTRUTURAL DO SÍTIO ATIVO DE LIPASES SEGUNDO A REGRA DE Kazlauskas et al. (1991)

(a) Enantiômero de reação mais rápida; (b) enantiômero de reação mais lenta.

Fonte: Ghanem (2007).

Utilizando como referência o grupo hidroxila do álcool, o grupo grande (L) fica à esquerda, e o grupo médio (M), à direita da hidroxila (Figura 7a). Assim, os grupos L e M são acomodados em cavidades condizentes com os tamanhos distintos destes grupos, segundo uma geometria denominada de “modo produtivo”. Quando o outro enantiômero interage com o sítio ativo da enzima, é então forçado a acomodar seu maior substituinte no menor espaço (modo não produtivo) (Figura 7b), sendo esse encaixe energeticamente desfavorável, pois o impedimento estérico entre o substituinte (L) e o bolso do sítio ativo menor perturba a tríade catalítica, diminuindo a velocidade da reação para este enantiômero (GHANEM, 2007; KAZLAUSKAS et al., 1991)

O parâmetro utilizado para descrever a enantiosseletividade da enzima é a razão enantiomérica (E) (GHANEM, 2007; FABER, 2000). O valor de E é definido como a razão da constante de especificidade para os dois enantiômeros, descrita pela Equação 2.1,

$$E_{RS} = \frac{(K_{cat}/K_M)_R}{(K_{cat}/K_M)_S} \quad (2.1)$$

onde K_{cat} é a constante de velocidade e K_M é a constante de Michaelis-Menten (GHANEM, 2007).

Para o cálculo do valor de E , Chen et al. (1982) desenvolveram uma equação (Eq. 2.2) baseada em reações uni-uni e irreversíveis, utilizando valores experimentais de excesso enantiomérico (ee_s ou ee_p) e de uma dada fração de conversão (c).

$$E = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_s)]}{\ln[(1-c)(1+ee_s)]} = \frac{\ln[(1-c)(1-ee_p)]}{\ln[(1-c)(1+ee_p)]} \quad (2.2)$$

O excesso enantiomérico descreve a pureza quiral dos compostos e é descrito pela Equação 2.3,

$$\% ee_R = \frac{R - S}{R + S} \times 100 \quad \text{para } R > S \quad (2.3)$$

onde R é a concentração do enantiômero (R) e S é a concentração do enantiômero (S). Para uma mistura racêmica, o valor de ee é sempre zero, enquanto para um composto enantiomericamente puro é 1 (ou 100%) (GHANEM, 2007).

Segundo Ghanem (2007), valores de E iguais a 1 correspondem à uma reação não-seletiva. Para uma resolução cinética ser considerada aceitável, o valor de E deve ser no mínimo 20. Em geral, enzimas utilizadas em resoluções exigem um valor de E de 50 ou maior, sendo E maior que 100 considerado excelente (SUNNA et al., 2002).

2.1.3 Fontes de Lipases

As lipases são comumente encontradas na natureza podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas (GUPTA et al., 2004). No entanto, as lipases obtidas de micro-organismos são as mais utilizadas em processos industriais pela facilidade de manipulação genética e pela facilidade de produção devido ao rápido crescimento dos micro-organismos. A produção de enzimas por via microbiana também permite fácil controle das condições de cultivo e pode ser realizada em escala industrial relativamente com baixos custos (HASAN et al., 2006; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999). Além disso, as diferentes aplicações industriais de lipases microbianas advêm de suas propriedades cinéticas distintas, como por exemplo, atividade em amplo intervalo de pH (3 - 11) e temperatura (30 – 60 °C) e sua não dependência de cofatores (GUPTA et al., 2004). Entretanto, a existência de enzimas com propriedades requeridas nesses processos é sempre limitada e nesse sentido, impulsionam uma grande procura por novos micro-organismos produtores de lipases que superem essas condições (ROH e VILLATTE, 2008).

Normalmente, a busca de novas enzimas microbianas é realizada através de métodos convencionais de isolamento e cultivo dos organismos, a partir de amostras do meio ambiente. Entretanto, essas técnicas apresentam limitações, pois apenas uma pequena proporção (cerca de 5%) destes micro-organismos pode ser cultivada *in vitro*. Para superar essa limitação, diferentes abordagens vêm sendo utilizadas para obtenção de novas enzimas de interesse biotecnológico. Estratégias baseadas em biologia molecular e engenharia de proteínas têm sido empregadas com sucesso para encontrar ou criar o biocatalisador desejado (JAEGER et al., 2001). Por exemplo, através de uma série de estratégias disponíveis em mutagênese e evolução dirigida, avanços significativos podem ser alcançados para modificar e controlar as propriedades de uma enzima, originando biocatalisadores mais seletivos com estabilidade a altas temperaturas e em solventes orgânicos (FORDE et al., 2010). Recentemente, Wahab et al. (2012) realizaram uma mutagênese sítio-dirigida no “bolso” oxianion Q114 no sítio ativo da lipase T1 de *Geobacillus zalihae*, onde foram adicionados resíduos hidrofóbicos de Met e Leu, originando duas variantes da lipase, Q114L e Q114M. Foi observado um aumento na enantiosseletividade ($E = 53$) na

variante Q114M em relação à lipase selvagem T1 ($E = 19$) na resolução do composto (*R,S*)-ibuprofeno.

Nos últimos anos, a triagem de enzimas em bibliotecas metagenômicas tem-se mostrado uma alternativa eficiente para encontrar novos biocatalisadores de origem diversificada. Por essa técnica, uma coleção de clones pode ser obtida a partir de fragmentos de DNA coletados em determinados ambientes. Dessa forma, a limitação imposta pelo cultivo de microrganismos *in vitro* é superada, pois a técnica envolve a clonagem direta de fragmentos de DNA de amostras ambientais sem a necessidade de isolamento e cultivo (HANDELSMAN, 2004; RONDON et al., 2000).

Em resumo, a técnica de metagenômica consiste na extração dos fragmentos de DNA de determinado ambiente e posterior seqüenciamento e análise. Através técnicas de biologia molecular, os fragmentos de DNA extraídos são selecionados e unidos a vetores de clonagem. Os vetores são inseridos em uma bactéria hospedeira cultivável em laboratório, normalmente *Escherichia coli*, originando uma coleção de clones. Os clones são submetidos à etapa de triagem para a propriedade desejada, que pode ser uma atividade enzimática ou diferentes produtos, tais como biosurfactantes e antibióticos (RONDON et al., 2000; HANDELSMAN et al., 1998). Enzimas de interesse biotecnológico, tais como lipases (CHOW et al., 2012; FERNÁNDEZ-ÁLVARO et al., 2010; JEON et al., 2009), celulases (HEALY et al., 1995), proteases (GUPTA et al., 2002), nitrilases (BAYER et al., 2011), beta-glucosidases (WANG et al., 2010; JIANG et al., 2011), descarboxilases (JIANG et al., 2009), epóxido hidrolases (KOTIK et al., 2010) xilanases (LEE et al., 2006), oxidoredutases (KNIETSCH et al., 2003), amidases e peptidases (GABOR et al., 2004) já foram obtidas de bibliotecas metagenômicas construídas a partir de amostras de diferentes ambientes.

2.1.4 Lipases Obtidas por Prospecção Metagenômica

Lipases bacterianas já foram obtidas a partir de prospecção metagenômica de diferentes ambientes. Dentre os trabalhos mais recentes, Chow et al. (2012) identificaram duas novas lipases termoestáveis (LipS e LipT) a partir de amostras de solo do Jardim Botânico da cidade de Hamburgo (Alemanha). As lipases

apresentaram temperatura ótima de atividade a 70 °C e LipS manteve 50% de sua atividade residual após 4 h de incubação a 90 °C. LipS também apresentou alta seletividade para (*R*)-fenil-éster de ibuprofeno com um excesso enantiomérico (ee) de 99%, e coeficiente de enantiosseletividade $E = 4$. Lee et al. (2012) isolaram uma nova lipase a partir de uma biblioteca a partir de sedimentos de maré na Coréia do Sul. A nova lipase denominada MPLaG, apresentou 99% de similaridade com a fosfolipase A de *Grimontia hollisae*. A lipase apresentou uma atividade específica de $2\,957 \pm 144 \text{ U mg}^{-1}$ contra óleo de oliva e especificidade na hidrólise do ésteres para *p*-nitrofenil palmitato (C16) e 1,2-dihexanoil-fosfatidilcolina (C8). Fan et al. (2011) purificaram e caracterizaram uma nova lipase (OSTL28) a partir de uma biblioteca montada de amostras de solo da China contaminados com óleo. A enzima apresentou estabilidade entre pH de 4,5-9,5 e a temperaturas inferiores a 65 °C após 5 h de incubação. A enzima também se mostrou estável a diferentes solventes orgânicos (25% v/v) por 24 h, com destaque para glicerol, metanol e DMSO. Correia (2010) montou uma biblioteca metagenômica a partir de solo da região do Cerrado brasileiro e encontrou clones positivos para atividade lipolítica. Um clone foi caracterizado e a partir de seu sequenciamento, foi mostrado que sua identidade era de no máximo 63% com a lipase de *Sulfolobus acidocaldarius* (AAC67392.1) e permitiu inferir que se tratava de uma lipase nova, não pertencente a nenhuma família já descrita. Glogauer et al. (2011) isolou uma nova lipase (LipC12) a partir de amostras de solo contaminados com gordura animal. A enzima foi estável em concentrações de até $3,7 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl, à temperaturas entre 20 e 50 °C, com máxima atividade a 30 °C após 1 h de incubação. A enzima purificada apresentou atividade específica de 1722 U mg^{-1} e 1767 U mg^{-1} contra óleo de oliva e gordura de porco, respectivamente.

Clones positivos para lipases e esterases, também foram obtidos a partir de bibliotecas oriundas de amostras de mangue (COUTO et al., 2010); solo de floresta Atlântica (FAORO et al., 2011), solo de compostagem (KIM et al., 2010; LAMMLE et al., 2007), solo contaminado por óleo (ELEND et al., 2006), lodo de estação de esgoto (ROH e VILLATTE, 2008), ambientes térmicos (TIRAWONGSAROJ et al., 2008; RHEE et al., 2005) e sedimentos marinhos (HU et al., 2010; HÅRDEMAN e SJÖLING, 2007; PARK et al., 2007).

Embora exista um grande número de trabalhos sobre novas lipases obtidas por metagenômica, estudos sobre a imobilização e o comportamento destas enzimas em meios orgânicos e em reações de síntese ainda não foram relatados na literatura.

Nesse sentido, o presente trabalho teve por objetivo começar a preencher essa lacuna, dando continuidade na caracterização de uma nova lipase obtida por metagenômica visando aplicações em biocatálise.

2.1.4.1 Lipase LipC6G9

Uma biblioteca metagenômica foi construída por Glogauer et al. (2011) a partir de amostras de solo contaminado com alto teor de gordura animal. A biblioteca, denominada SCGA (Solo Contaminado com Gordura Animal) possui cerca de 500.000 clones. Glogauer et al. (2011) realizou uma seleção dos clones com atividade lipolítica contra diferentes substratos. A partir dessa triagem, 2661 clones apresentaram atividade contra tributirina, e 127 apresentaram atividade contra a tricaprilina. Em uma segunda triagem, do total de 127, 32 clones apresentaram halo de hidrólise contra trioleína. Finalmente, os três clones que apresentaram os maiores halos de hidrólise com trioleína foram selecionados para o sequenciamento, identificação e análise dos genes responsáveis pela atividade lipolítica. Como resultado, um gene para uma nova lipase (*lipC6G9*) associado a um gene de foldase (*lifC6G9*) foram identificados e sequenciados por Martini (2012). O primeiro apresentou 96% de identidade com a lipase de *Aeromonas veronii* B565, e o segundo, 77% de identidade com a foldase do mesmo microrganismo. A análise filogenética para a nova lipase LipC6G9 identificou-a como pertencente à família I.1, na qual estão inclusas as lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas veronii* (MARTINI, 2012). Algumas lipases desta subfamília são secretadas pelo sistema de secreção do tipo 2 ou Sec e dependem de chaperonas específicas denominadas de *Lif* (*lipase-specific foldase*) (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

A análise da sequência de LipC6G9 comparada com outras estruturas de lipases bacterianas revelou um possível sítio de ligação do íon cálcio na região C-terminal da enzima. LipC6G9 também contém dois resíduos de cisteína (Cys²⁰¹-Cys²⁵²) que são preditos como formadores de uma ligação dissulfeto em outras lipases do mesmo gênero (MARTINI, 2012).

Martini (2012) realizou testes de expressão e atividade para combinações individuais e co-expressões da lipase e da foldase. Os testes de expressão e atividade mostraram que LipC6G9 precisa ser expressa junto com a foldase LifC6G9 para exibir atividade. Também foi verificado que, após a purificação, LipC6G9 permanece complexada a LifC6G9 (Figura 8).

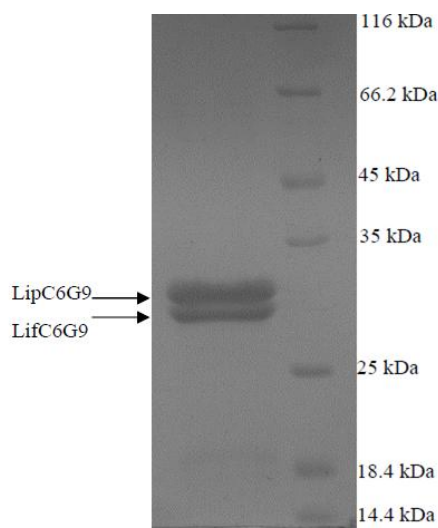


FIGURA 8 - GEL SDS-PAGE DA LIPASE LIPC6G9 COMPLEXADA À SUA FOLDASE LIFC6G9 APÓS A PURIFICAÇÃO

Fonte: Martini (2012).

Os estudos de caracterização cinética de LipC6G9 livre em meio aquoso revelaram que a enzima possui preferência por substratos de cadeia média (tricaprilina, 1500 U mg⁻¹) e curta (tributirina, 1800 U mg⁻¹), e também apresenta atividade para o substrato de cadeia longa (trioleína, 820 U mg⁻¹), o que a caracteriza como uma lipase verdadeira. A enzima livre mantém atividade em uma ampla faixa de pH (6,5 - 10,5) e temperatura, sendo estável quando incubada por 1 h até 40 °C. A enzima também se mostrou estável em uma faixa de pH (6,0 - 9,5) quando incubada por 90 min (MARTINI, 2012).

Os resultados reportados por Martini (2012) revelaram que LipC6G9 tem um grande potencial para aplicações biotecnológicas, o que justificou a realização deste trabalho. Além disso, estudos envolvendo lipases complexadas com sua respectiva foldase são escassos na literatura. Dentre trabalhos mais recentes, Madan e Mishra (2010) utilizaram a mesma estratégia de co-expressão de Lip-LifC6G9, o

redobramento *in vivo*, para a lipase de *P. aeruginosa* B2264. Os autores reportaram que a lipase apresentou atividade em amplo intervalo de pH (5,0 – 9,0), com máxima atividade (225 U mg⁻¹) a 37 °C, pH 8,0 utilizando como substrato o palmitato de *p*-nitrofenila, que não é específico para lipases. Zheng et al. (2012) caracterizaram uma lipase com sua respectiva foldase de *Acinetobacter* sp. XMZ-26 a partir de uma biblioteca metagenômica. A lipase se mostrou estável na presença de vários detergentes (SDS, Tween-20 a 0,05%) e solventes orgânicos (metanol, DMSO 30% v/v) e apresentou atividade máxima a 55 °C, pH 9,0 contra palmitato de *p*-nitrofenila. Peng et al. (2011) imobilizaram a lipase de *P. aeruginosa* CS2 co-expressa com sua foldase em Celite-545. A enzima livre apresentou estabilidade em diferentes solventes orgânicos, como *n*-heptano, hexano e DMSO após 9 h de incubação e quando imobilizada, foi reutilizada na síntese de acetato de butila em *n*-heptano por cinco vezes sem perda de atividade. Em relação a estudos envolvendo imobilização de lipases complexadas com sua foldases, o trabalho de Peng et al. (2011) é o único relatado na literatura.

2.2 BIOCATÁLISE EM MEIOS NÃO-CONVENCIONAIS

Nos últimos anos, a biocatálise surgiu como uma importante área de pesquisa e desenvolvimento industrial impulsionando a produção de muitos compostos importantes, como materiais de partida para a síntese de polímeros, intermediários enantiomericamente puros para a produção de fármacos e agroquímicos, antibióticos e ingredientes para indústria alimentar, como adoçantes e vitaminas (HASAN et al., 2006; KRISHNA, 2002).

O termo biocatálise pode ser definido como um processo em que um catalisador biológico é utilizado para converter um substrato utilizando um número limitado de etapas. Esse processo inclui a seleção de um meio reacional, que pode ser um meio convencional (meio aquoso) ou meios não-aquosos, também chamados de não-convencionais. Entretanto, a água não é um solvente adequado para aplicações em biocatálise, uma vez que não favorece reações de síntese e limita a produtividade de diversos processos, principalmente os que envolvem substratos hidrofóbicos. Nesse sentido, a utilização de meios não convencionais tornou-se uma

estratégia interessante para realização de diversos processos mediados por enzimas (KRIEGER et al., 2004; AIRES-BARROS, 2002).

Em biocatálise, os meios não-convencionais (onde o teor de água é limitado) utilizados podem ser classificados em solventes orgânicos, fluidos supercríticos, sistemas livres de solvente (onde apenas os substratos da reação compõem o meio reacional), líquidos iônicos e sistemas micelares (KRISMA, 2002; AIRES-BARROS, 2002). Entretanto, é válido ressaltar que, apesar da designação de “meios aquo-restritos”, um teor mínimo de água é requerido para manutenção da estrutura ativa da enzima (KLIBANOV, 2001).

Dentre os meios não-convencionais, a aplicação de enzimas em solventes orgânicos é mais estudada, pois esse sistema oferece numerosas vantagens, tais como o aumento da solubilidade de substratos e produtos hidrofóbicos no sistema reacional, o deslocamento do equilíbrio da reação no sentido da síntese e a eliminação de contaminação microbiana (DOUKYU e OGINO, 2010). Apesar dessas vantagens, a natureza do solvente orgânico é um fator importante a ser considerado na catálise enzimática, pois este pode afetar diretamente a atividade e a estabilidade da enzima (VILLENEUVE, 2007).

Para superar os problemas de baixa estabilidade e atividade de enzimas em solventes orgânicos, novas estratégias vêm sendo descritas na literatura envolvendo engenharia de proteínas e engenharia do meio reacional vêm sendo empregadas (DOUKYU e OGINO, 2010). Alternativamente, triagens de enzimas naturalmente tolerantes a solventes orgânicos vêm sendo realizadas (AHMED, RAGHAVENDRA e MADAMWAR, 2010; DOUKYU e OGINO, 2010; DANDAVATE et al., 2009). Na última década, novas lipases e esterases tolerantes a solventes orgânicos foram isoladas através de triagens de micro-organismos, tais como *Pseudomonas spp.*, *Burkholderia cepacia*, *Bacillus spp.*, *Archaea termofílicas*, dentre outros (DOUKYU e OGINO, 2010). Recentemente, novas lipases e esterases estáveis a solventes orgânicos também foram obtidas através da técnica da metagenômica (GLOGAUER et al., 2011; COTE e SHARECK 2010). Jin et al. (2012) isolaram uma nova esterase (EstC23) por metagenômica. A enzima manteve mais de 90% de atividade residual após 7 dias de incubação em 50% (v/v) de *n*-hexano, benzeno, metanol e tolueno. Fan et al. (2011) avaliaram a estabilidade da nova lipase OSTL28 frente a solventes orgânicos (25% v/v) por 24 h. A enzima se mostrou estável em solventes polares como DMSO, metanol e glicerol mantendo mais de 90% de atividade residual e em solventes

apolares como éter de petróleo, *n*-hexano e *n*-dodecano apresentando mais de 100% de atividade residual. Martini (2012) avaliou a estabilidade de LipC6G9 frente a diferentes solventes polares, como acetona, acetonitrila, etanol, isopropanol, THF e DMSO. A enzima manteve mais de 80% de atividade residual em todos os solventes avaliados após 1,5 h de incubação em 30% (v/v). Em proporções maiores (50% e 75% v/v), a atividade residual após incubação decresceu para todos os solventes avaliados, com exceção de DMSO, onde a enzima manteve mais de 80% de atividade residual.

2.2.1 A Influência do Solvente Orgânico

Muitas enzimas são facilmente desnaturadas e inativadas na presença de solventes orgânicos. A baixa atividade e a inativação estão relacionadas com as propriedades dos solventes, tais como polaridade ($1/\epsilon$), hidrofobicidade (geralmente relacionada com $\log P$), a geometria molecular e habilidade de solvatação e a constante dielétrica dos solventes orgânicos (KLIBANOV, 2001; ADLERCREUTZ, 2000).

Em solventes orgânicos, as enzimas permanecem, de certa forma, “aprisionadas” em sua conformação nativa. Isto se deve a baixa constante dielétrica dos solventes, responsáveis então pelo aumento nas interações eletrostáticas dos resíduos carregados das proteínas, o que causa diminuição da flexibilidade interna tornando as enzimas menos ativas (ADLERCREUTZ, 2000). Assim, a flexibilidade conformacional da proteína também é considerada fator crucial para manutenção de sua função. A presença de uma camada de água essencial ligada à superfície da enzima é necessária para que ocorra a flexibilidade conformacional e a atividade enzimática (KLIBANOV, 1997).

O principal parâmetro utilizado em biocatálise para descrever a polaridade do solvente e seus principais efeitos na atividade da enzima é o $\log P$, e mesmo que haja numerosas exceções, o parâmetro $\log P$ é o que apresenta melhor correlação com a atividade de enzimas. Esse parâmetro é definido como o logaritmo do coeficiente de partição do solvente num sistema padrão *n*-octanol/água, conhecido como parâmetro Hansch. O valor de $\log P$ pode ser calculado através do método das constantes

hidrofóbicas fragmentadas de Rekker (LAANE; BOEREN; VEEGER, 1987). Em relação a lipases, os solventes orgânicos hidrofóbicos com log P acima de 2,5 são considerados biocompatíveis, enquanto os solventes orgânicos hidrofílicos interagem fortemente com a camada essencial de água que envolve a enzima, desnaturando-a (KRIEGER et al., 2004; KLIBANOV, 2001).

Entretanto, o efeito dos solventes é distinto para cada enzima. Na literatura, pode-se observar que os trabalhos que exploram esse tema têm a preocupação em salientar que os resultados alcançados são restritos ao sistema e à enzima estudada, evitando-se generalizações. Liu et al. (2010) investigaram o pré-tratamento da lipase de *P. cepacia* imobilizada em solventes orgânicos com diferentes hidrofobicidades, grupos funcionais e constituição molecular. Os autores observaram variações significativas na estrutura secundária da enzima, principalmente no conteúdo de α -hélices e folhas β após o pré-tratamento. Uma diminuição no conteúdo de α -hélices foi relacionada com a diminuição na atividade de esterificação da lipase. Entretanto, essa correlação fica restrita apenas às condições metodológicas realizadas no trabalho. Hernandez-Rodriguez et al. (2009) avaliaram a estabilidade de lipases produzidas por fermentação em estado sólido de diferentes cepas. Os autores correlacionaram a estabilidade enzimática em solventes orgânicos de acordo com o grupo funcional (apolares, polares próticos e polares apróticos). Todas as lipases avaliadas apresentaram uma elevada atividade (superior a 90%) em solventes apolares e polares apróticos (acetona, acetonitrila e acetato de etila), enquanto que em solventes polares próticos (etanol e *n*-propanol), a atividade foi reduzida (inferior de 40%) em relação ao controle, não sendo observada uma correlação entre a estabilidade e log P. Os autores sugeriram que a interação entre os solventes apróticos polares e a enzima não afetou o nível de hidratação da molécula, mantendo a conformação necessária para a enzima manter sua atividade.

2.2.2 O Papel da Água

Em um meio não convencional, a quantidade de água presente no sistema influencia diretamente na atividade catalítica da enzima. As moléculas de água são essenciais à enzima porque promovem interações que permitem o dobramento da

proteína em sua estrutura tridimensional nativa, cataliticamente ativa. Dessa forma, qualquer modificação nesta camada de hidratação pode promover uma redução da atividade enzimática (MA; PERSSON; ADLERCREUTZ, 2000).

Entretanto, em reações de síntese, por exemplo, a quantidade de água presente no meio reacional, assim como qualquer outro substrato ou produto, afeta também o equilíbrio termodinâmico entre as reações catalisadas pelas enzimas, alterando a conversão de equilíbrio, embora não modifique a constante de equilíbrio (VILLENEUVE, 2007; MA; PERSSON; ADLERCREUTZ, 2000). Além disso, dependendo do tipo de suporte em que a enzima estiver imobilizada, como por exemplo, um suporte de matriz hidrofílica, a quantidade de água envolvendo a enzima pode dificultar a transferência do substrato hidrofóbico do meio reacional para a enzima (GAYOT; SANTARELLI; COULON, 2003).

A quantidade de água presente em um sistema geralmente é definida pela atividade termodinâmica de água (a_w). Ela é definida como a razão entre a pressão parcial da água no sistema (p_w) e a pressão parcial da água pura (p_w°) (Eq. 2.4). Os valores de a_w estão situados entre 0 e 1, sendo que em a_w de 1 já existe uma fase aquosa distinta e pura (KVITTINGEN et al., 1992).

$$a_w = p_w / p_w^\circ \quad (2.4)$$

O valor ótimo de a_w varia de acordo com a reação a ser catalisada, com a enzima utilizada e com o tipo de suporte caso esta estiver imobilizada. Isto se deve aos diferentes grupos funcionais e arranjos tridimensionais que cada enzima possui ou à hidrofobicidade do suporte (SALIS; SOLINAS; MONDUZZI, 2003). Geralmente, os valores ótimos de a_w para lipases em reações de síntese estão entre 0,25 e 0,45 (VILLENEUVE, 2007).

2.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

O processo de imobilização têm um importante papel dentro da biocatálise, pois há diversos problemas na utilização de enzimas em sua forma livre. Dentre eles, citam-se a instabilidade de sua estrutura cataliticamente ativa, sua sensibilidade a

condições de processos (temperatura e solventes orgânicos) e dificuldades de recuperar e reciclar a enzima e recuperar os produtos do meio reacional (KRAJEWSKA, 2004). Diante desses problemas, o uso de enzimas imobilizadas oferece vantagens em processos industriais, como se segue: a) evita a formação de agregados em meio orgânico, pois nestes meios, enzimas livres tendem a se agregar e a aderirem nas paredes do reator, o que não é observado em enzimas imobilizadas em suportes sólidos; b) facilita a recuperação do biocatalisador, pois enzimas imobilizadas podem ser recuperadas do meio reacional por filtração ou centrifugação, o que também facilita a separação dos produtos e permite a reutilização da enzima; c) pode alterar favoravelmente propriedades enzimáticas, como a atividade e estabilidade, dependendo da enzima e do suporte utilizados (MATEO et al., 2007; SALIS et al., 2005; GUISÁN et al., 2001; VILLENEUVE et al., 2000).

A escolha da estratégia de imobilização é realizada pela avaliação de diferentes parâmetros, tais como a eficiência imobilização (E), retenção de atividade (R), a desnaturação da enzima durante o processo, a toxicidade dos reagentes utilizados e propriedades finais desejadas do derivado imobilizado (VILLENEUVE et al., 2000). Os métodos de imobilização apresentam suas vantagens e desvantagens; portanto, dependendo da aplicação e da avaliação dos parâmetros citados anteriormente é que se escolhe o método mais adequado, pois não existem métodos ou protocolos específicos para cada família de enzimas.

2.3.1 Métodos de Imobilização

A imobilização de enzimas pode ser definida como uma técnica de “aprisionar” ou “ligar” a enzima a suportes inertes por meios físicos ou químicos, tornando-as insolúveis em qualquer meio, mas permitindo que a enzima entre em contato com o substrato, catalisando as reações. Os métodos químicos envolvem a ligação da enzima em uma matriz por ligações covalentes ou ligações cruzadas, e os físicos podem ser por adsorção da enzima em uma matriz sólida, aprisionamento em polímeros geleiformes ou por microencapsulamento em micelas (VITOLLO, 2001, PAIVA; BALCÃO; MALCATA, 2000).

O método de adsorção física da enzima é simples, barato e efetivo. Ele consiste na adsorção da enzima em um suporte inerte, através de ligações eletrostáticas ou hidrofóbicas, tais como interações iônicas, forças de “van der Waals”, ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo e interações hidrofóbicas (VILLENEUVE et al., 2000). Este tipo de imobilização causa pequena modificação na estrutura nativa da enzima, se comparado aos outros tipos de imobilização, e por isso, geralmente não promove perda da atividade catalítica (SALIS et al., 2003). Entretanto, esta técnica possui como desvantagem a baixa energia de ligação entre a enzima e o suporte. Dessa forma, pode ocorrer dessorção da enzima do suporte quando submetida a variações de temperatura, pH ou mesmo na presença do substrato (KRAJEWSKA, 2004 ; VILLENEUVE et al., 2000).

Nos métodos de imobilização que envolvem ligação covalente, a enzima é ligada ao suporte inerte mediante ligações que são normalmente estabelecidas entre os grupos amino primários e o anel fenólico dos aminoácidos constituintes da enzima e os grupos reativos do suporte. Essa técnica apresenta maior custo e, além disso, as enzimas podem facilmente perder a atividade depois da imobilização, por mudança de sua conformação. Entretanto, se a mudança conformacional após o estabelecimento da ligação covalente for favorável, pode propiciar, além de um aumento na atividade, uma maior estabilidade da enzima, pois estas se tornam menos flexíveis (MATEO et al., 2007; KRAJEWSKA, 2004).

No caso do entrelaçamento em polímeros, as enzimas são aprisionadas entre as malhas de um polímero geleiforme ou separadas por uma membrana semipermeável. A eficiência do entrelaçamento, a permeabilidade do gel e sua resistência mecânica dependerão da composição dos reagentes e da natureza do monômero utilizado. O microencapsulamento consiste na preparação de um sistema emulsionado, onde a enzima está confinada no interior de micelas. Nesses dois sistemas, as limitações difusionais podem ser intensas (KRAJEWSKA, 2004; SALIS et al., 2003).

2.3.2 Imobilização de Lipases

As lipases têm sido imobilizadas em diferentes suportes de natureza orgânica e inorgânica através de diferentes métodos de imobilização, tais como adsorção física,

confinamento em matrizes poliméricas, ligações covalentes promovidas por agentes multifuncionais e encapsulação em membranas e em micelas reversas. Dentre todos os métodos de imobilização de lipases, a adsorção física é ainda o mais utilizado devido à facilidade e simplicidade de metodologia e ao menor custo e por não afetar negativamente a atividade (PAIVA; BALCÃO; MALCATA, 2000).

A imobilização por adsorção é normalmente realizada pela incubação do suporte junto à solução com a enzima em tampão ou pela precipitação da lipase com solventes como acetona sobre a superfície do suporte. Os tampões utilizados no processo são de baixa força iônica, pois ao contrário do que ocorre com outras proteínas, a adsorção de lipases é mais seletiva nesse meio (BASTIDA et al., 1998).

A imobilização de lipases por adsorção física é normalmente realizada em suportes hidrofóbicos. Em geral, lipases sofrem ativação interfacial na presença da interface hidrofóbica do suporte, sendo adsorvidas em sua superfície, mantendo a “lid” em sua conformação aberta (Figura 9). Esta conformação torna a preparação imobilizada altamente ativa, principalmente contra substratos hidrofóbicos (MATEO et al., 2007; PERSSON et al., 2002; PALOMO et al., 2002a; BASTIDA et al., 1998).

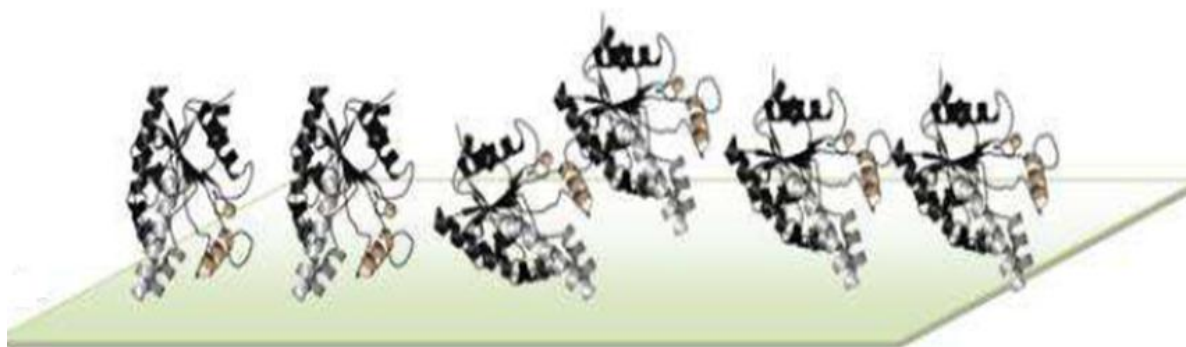


FIGURA 9 - IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES POR ADSORÇÃO FÍSICA EM SUPORTES HIDROFÓBICOS

Fonte: Martini (2012).

Palomo et al. (2002b) imobilizaram as lipases de *Candida antarctica*, *Mucor miehei* e *C. rugosa* em octadecil-sepabeads por adsorção, em glioxil-agarose por ligação covalente multipontual e em glutaraldeído-agarose por ligação covalente. Foi observada a ocorrência de hiperativação nas lipases imobilizadas no suporte

hidrofóbico por adsorção pelo aumento da atividade específica de até 20 vezes em comparação com enzima solúvel. Os autores atribuíram esse resultado ao fato da lipase estar sendo imobilizada em sua conformação “aberta”, enquanto a enzima solúvel e outros biocatalisadores obtidos por imobilização covalente multipontual proporcionaram a imobilização da lipase na sua forma “fechada” (Figura 10).

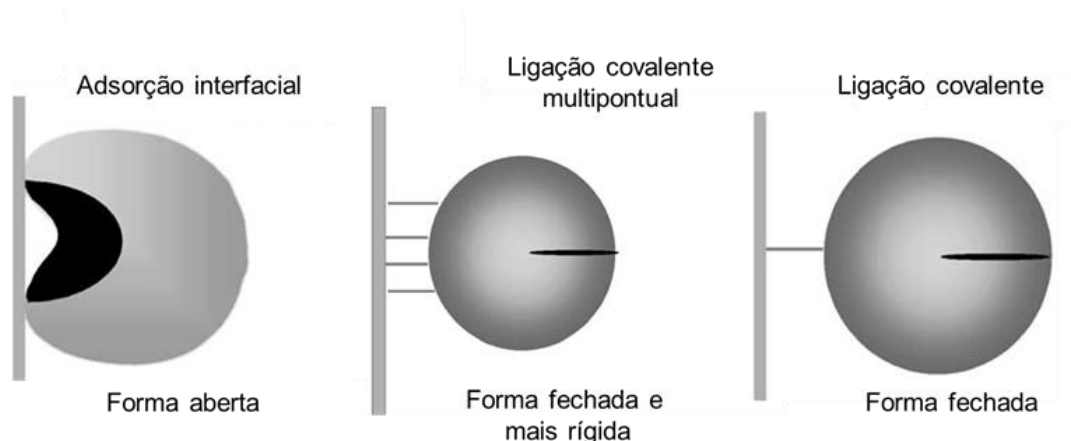


FIGURA 10 - CONFORMAÇÕES DE LIPASES IMOBILIZADAS EM DIFERENTES SUPORTES

Fonte: Adaptado de Palomo et al. (2002b).

Outros autores também relataram a imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos. Baron (2008) trabalhou com a lipase de *B. cepacia* LTEB11 e utilizou o extrato bruto obtido através de fermentação submersa deste micro-organismo para a imobilização em diversos suportes. O suporte que apresentou a melhor eficiência de imobilização (100%) e melhor retenção de atividade em meio orgânico (193%) foi o Accurel EP-100, um polipropileno altamente poroso, o que indicou que a lipase foi eficientemente imobilizada, como também, que apresentou modificações estruturais favoráveis à catálise após a imobilização. Salum et al. (2010) estudando a mesma lipase imobilizada em Accurel EP-100, obteve excelentes resultados na reação de esterificação entre o ácido oleico e o etanol em *n*-heptano, com 100% de conversão em 3 h. A enzima imobilizada também apresentou melhores resultados comparados a outros sistemas, como em sistema micelar e a adição direta do extrato lipolítico liofilizado no meio reacional. Madalozzo (2011) imobilizou a lipase recombinante de *Rhizopus oryzae* em Accurel MP-1000 e obteve 96% de eficiência de imobilização. A lipase imobilizada apresentou maior estabilidade, tanto à temperatura quanto a

solventes orgânicos, em relação à forma livre, sendo estável no solvente *n*-heptano a 40 °C, onde houve retenção de 77% da atividade após incubação por 24 h.

O recente interesse em nanotecnologia tem proporcionado uma riqueza de diferentes suportes para imobilização de enzimas com grande potencial em aplicações em biocatálise. Como uma estratégia promissora, nanopartículas magnéticas como magnetita (Fe_3O_4) e maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) têm sido utilizadas como materiais de suporte para imobilização de lipases, exibindo características marcantes, como a grande área de superfície, mobilidade e alta transferência de massa, além de ser facilmente recuperadas do meio reacional por aplicação de um campo magnético externo (NETTO et al., 2013; ANSARI et al., 2012). Sui et al. (2012) imobilizaram a lipase de *C. rugosa* em nanopartículas (Fe_3O_4) ativadas com ácido glucônico. A enzima manteve 80% de atividade residual a 55 °C, enquanto a enzima livre apresentou apenas 20%, após 1 h de incubação. Xie et al. (2010) ativaram nanopartículas (Fe_3O_4) com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodi-imida para a imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosa* e sua aplicação em reações de transesterificação em sistema livre de solvente. Foram obtidos 90% de conversão após 30 h de reação e a enzima foi reutilizada por três ciclos mantendo 90% de atividade residual. Kim et al. (2009) imobilizaram a lipase de *Bacillus stearothermophilus* através de sua calda His-tag em nanopartículas magnéticas revestidas com sílica complexada com íons Cu^{2+} . A lipase imobilizada manteve 70% de atividade residual após cinco ciclos de ensaios de hidrólise de *p*-nitrofenila, enquanto outras preparações perderam consideravelmente a atividade nas mesmas condições do ensaio. Segundo Netto et al. (2013), a utilização de nanopartículas representa uma abordagem eficaz da química verde, uma vez que ela prolonga, através dos sucessivos ciclos de recuperação, o tempo de vida útil do biocatalisador em comparação com outros suportes.

Lipases imobilizadas também estão disponíveis comercialmente. Dentre estas, destacam-se a lipase de *C. antarctica* tipo B (CALB) imobilizada em resina poliacrílica, com o nome comercial de Novozym 435, e a lipase de *Mucor miehei* imobilizada em resina de troca aniônica macroporosa (Lipozyme-IM), ambas comercializadas pela empresa Novozymes (Bagsvaerd, Danmark) (CHRISTENSEN et al., 2003). Entretanto, estes biocatalisadores são de alto custo, associado ao preço das matrizes hidrofóbicas. Uma alternativa é a utilização de matrizes de baixo custo, que é tema de diversos estudos e demonstra ser uma alternativa bastante promissora na inserção de

lipases em processos industriais. Exemplos de suportes com essa característica são a casca de ovo, a bentonita e os filossilicatos (MENDES, 2009).

2.4 LIPASES IMOBILIZADAS EM BIOCATÁLISE

A aplicação de biocatalisadores na indústria é objeto de muitas investigações, devido à sua alta atividade catalítica em comparação com os catalisadores convencionais, e ao fato de atuarem com alta eficiência em condições reacionais bastante suaves. A diversidade de propriedades das lipases e a possibilidade de atuarem em vários substratos, em meios aquosos ou aquo-restritos catalisando diferentes reações enzimáticas propiciam a utilização destas enzimas em diferentes campos de aplicação (HASAN et al., 2006.) A Figura 11 ilustra as principais reações catalisadas por lipases.

As propriedades de regioseletividade e estereoseletividade apresentadas pelas lipases associadas à sua versatilidade em solventes orgânicos têm se mostrado uma excelente alternativa para a produção de drogas quirais e de vários compostos orgânicos via resolução de racematos, tais como ácidos, ésteres, aminas, álcoois, (GOTOR-FERNÁNDEZ; BRIEVA, GOTOR, 2006).

Um exemplo clássico de aplicação de lipases na produção desses compostos é a produção do Diltiazem, um fármaco bastante prescrito no tratamento da hipertensão arterial. A lipase de *Serratia marcescens* catalisa a hidrólise de um epoxi-éster a partir de uma mistura racêmica. Essa é a etapa-chave da síntese, levando a um enantiômero puro, que é posteriormente convertido em Diltiazem. Esse processo é realizado pela empresa Tanabe Seiyaku S.A. desde 1993 e anualmente produz mais de 50 toneladas dessa molécula quiral (HOUDE et al., 2004; JAEGER et al., 1999). A Tabela 2 apresenta outros exemplos de aplicações industriais de lipases na obtenção de compostos opticamente puros (KRISHNA, 2002).

Pesquisas também vêm sendo desenvolvidas utilizando lipases tendo como produtos-alvo diversos derivados do ácido propiônico, utilizados como anti-inflamatórios, como o ibuprofeno (BENAIGES et al., 2010), cetoprofeno (TOLEDO et al., 2012), fluorbiprofeno e naproxeno (ANDREWS et al., 2011). Rouf et al. (2012) realizaram a síntese de ambos os enantiômeros do ácido 1,4-benzodioxan-2-

carboxílico, um intermediário chave para a síntese dos agentes terapêuticos piperoxano, dibozano e doxazosina utilizando a lipase de *Arthrobacter sp.* Foram obtidos ótimos valores de excesso enantiomérico ($ee = 99\%$), E acima de 200, em altas concentrações de substrato (50 g L^{-1}), utilizando *n*-butanol como cossolvente.

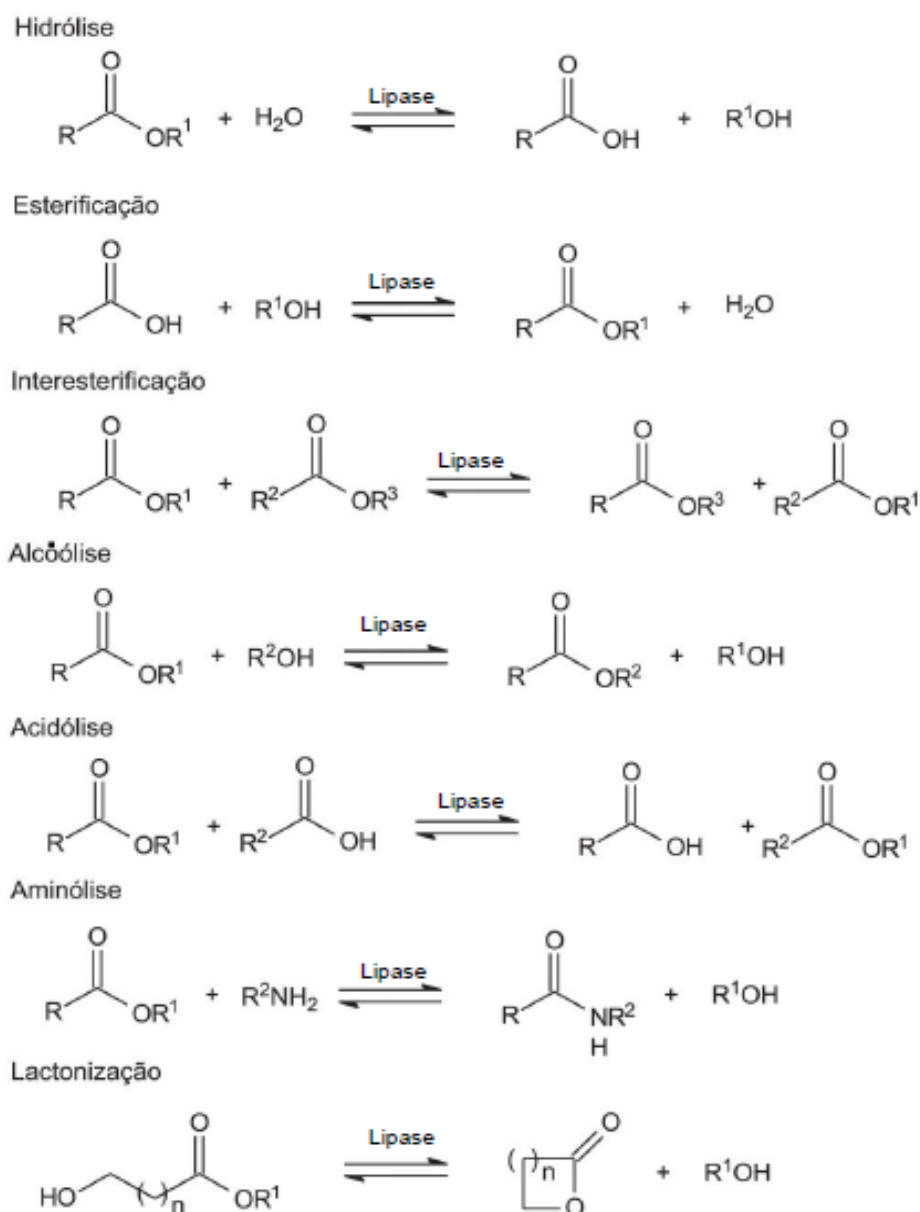


FIGURA 11 - PRINCIPAIS REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES

Fonte: Adaptado de Ghanem, (2007).

Uma classe de reações para as quais as empresas procuram novos biocatalisadores são as reações de amidação. A lipase de *Pseudomonas stutzeri*

(PSL), foi investigada por Van Pelt et al. (2011) em uma gama de reações de amidação, utilizando ésteres metílicos volumosos e aminas, apresentando resultados comparáveis com o derivado comercial Novozym 435.

TABELA 2 - PROCESSOS INDUSTRIAIS DE INTERMEDIÁRIOS QUIRAIS CATALISADOS POR LIPASES

Empresa	Reação	Fonte da Lipase	Produto	Escala
BASF	Hidrólise	<i>Burkholderia plantarii</i>	Álcoois e aminas quirais	>100 ton
Sepracor	Hidrólise	<i>Candida cylindracea</i>	S-ibuprofeno (anti-inflamatório)	kg
Bristol-Myers-Squibb (BMS)	Acetilação	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Hidroximetil coenzima A	kg
Uniquema	Esterificação	<i>Candida antarctica</i>	Miristato e palmitato de Isopropila	kg
Chiroscience	Hidrólise	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Intermediários na síntese anti-HIV; anticolesterolêmico,	kg

Fonte: Krishna (2002).

Lipases regioespecíficas têm grande aplicabilidade em reações de hidrólise ou esterificação seletiva de misturas de ácidos graxos, principalmente os polinsaturados, considerados essenciais ao organismo humano, como por exemplo, alfa-linolênico e ácido eicosapentânico (GANDHI et al., 2000). Lipases com esta característica também são utilizadas na modificação de óleos e gorduras e na síntese de lipídeos estruturados. Por exemplo, ácidos graxos de cadeia curta ou média podem ser incorporados nas posições *sn* 1,3 do triacilglicerol, utilizando lipases reconhecidamente *sn* 1,3 específicas, facilitando a absorção dos ácidos graxos no trato intestinal (NUNES et al., 2011). Dessa forma, é possível prever a alteração ou planejar modificação requerida no triacilglicerol, alterando suas características e melhorando suas propriedades nutritivas (GANDHI et al., 2000).

Atualmente no mercado são comercializados diversos produtos através dessa tecnologia, como por exemplo, o Marinol[®], um óleo enriquecido com ácidos graxos

poliinsaturados do tipo ômega 3; o Betapol[®], um substituto de leite materno, ambos fabricados pela empresa Loders-Croklaan nos Estados Unidos (MU e POSGAARD, 2005). Empresas na Suécia (AarhusKarlshamn) e nos Estados Unidos (Archer Daniels Midland Company) utilizam a lipase comercial Lipozyme TL imobilizada em reações de interesterificação para produção de margarinas (HOLM e COWAN, 2008).

As lipases também têm emprego na indústria de laticínios, sendo utilizadas no desenvolvimento de aromas e sabores, na hidrólise da gordura do leite e na aceleração dos processos de maturação de queijos (HASAN et al., 2006; KHEADR et al., 2003). Lipases também são aplicadas no tratamento de efluentes, sendo utilizadas para a remoção de óleo presente nas águas residuárias de fábricas ou de indústrias de refinação de óleos (ALBERTON et al. 2010; HASAN et al., 2006).

Nas reações de síntese, geralmente são utilizadas lipases imobilizadas em meios que podem ou não conter solventes. A Tabela 3 apresenta alguns exemplos de reações utilizando lipases imobilizadas para síntese de ésteres. Ésteres metílicos e etílicos derivados de ácidos graxos de cadeia longa, como os oleatos, palmitatos, ricinoleatos e linolenatos são os principais constituintes do biodiesel. A síntese de biodiesel pode ser realizada através de via química ou enzimática por meio de reações de esterificação ou transesterificação (TAN et al., 2010; MARCHETTI, MIGUEL e ERRAZU, 2007). A utilização de lipases para obtenção desse produto é alvo de intensas pesquisas na literatura. Lipases imobilizadas de diferentes micro-organismos foram empregadas na síntese de biodiesel, como por exemplo, a lipase *Candida antartica* (WANG et al., 2007; WATANABE et al., 2000; SHIMADA et al., 1999), *Pseudomonas fluorescens* (SOUMANOU e BORNSCHEUER, 2003; ISO et al., 2001) *P. cepacia* (SHAH e GUPTA, 2007; SALIS et al., 2005), *Rhizomucor miehei* e *Chromobacterium viscosum* (SHAH et al., 2004; YESILOGLU, 2004; SHIEH et al., 2003). Segundo TAN et al. (2010), dentre essa grande variedade de biocatalisadores, as lipases de *C. antartica* (Novozym 435) e de *Candida sp.* 99-125 são mais comumente empregadas na produção de biodiesel a partir de diferentes fontes, tais como banha de porco, óleo de soja, óleo de semente de algodão e óleos usados. Os autores também afirmam que o baixo custo da lipase imobilizada de *Candida sp.* 99-125 em membrana têxtil é bastante competitivo para seu uso em escala industrial.

A aplicação de lipases na síntese de ésteres a partir de ácidos graxos é também de grande interesse na indústria alimentícia, onde ésteres de cadeia alquílica de 2 a 8 carbonos são utilizados na forma de aromas e flavonóides (ABBAS;

COMEAU, 2003) e na síntese de ésteres de açúcar, formando produtos régio e estereosseletivos utilizados na síntese de adoçantes e outros ingredientes de alimentos (OKABE et al. 1999). Na indústria de cosméticos, lipases são utilizadas na síntese de ésteres como o miristato e o palmitato de isopropila, usados como emolientes em cremes e óleos de banho (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006); na indústria agroquímica, são empregadas na síntese de herbicidas, como o (S)-indanofan (JAEGER e EGGERT, 2002).

TABELA 3 - EXEMPLOS DE LIPASES IMOBILIZADAS EM SÍNTESE DE ÉSTERES

Lipase	Suporte	Éster Produzido	Cossolvente	Reação	Referência
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Sílica	Palmitato de frutose	<i>n</i> -heptano	Esterificação	Sutili et al. (2013)
<i>Lipase pancreática</i>	Immobead-350	Metil ésteres	ausência	Transesterificação	Dhake et al. (2012)
<i>Burkholderia sp.</i>	Nanopartículas	Metil ésteres	ausência	Transesterificação	Liu et al. (2012)
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Terra diatomácea	(S)-3-ciano-5-metilhexanóico	ausência	Hidrólise	Zheng et al.(2012)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Duolite ES 562	Butanoato de butila	<i>n</i> -hexano	Esterificação	Lorenzoni et al. (2012)
<i>Staphylococcus xylosus</i>	CaCO ₃	Poliésteres	ausência	Esterificação	Horchani et al. (2012)
<i>Candida antarctica</i> <i>P. fluorescens</i> <i>Thermomyces lanuginosus</i>	Polihidroxibutirato PHB	Metil ésteres	<i>n</i> -heptano	Transesterificação	Mendes et al. (2012)
<i>P. aeruginosa</i> CS2	Celite-545	Acetato de butila	<i>n</i> -heptano	Esterificação	Peng et al. (2011)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Accurel MP-1000	Oleato de etila	<i>n</i> -heptano	Esterificação	Madalozzo (2011)
<i>Amycolatopsis mediterranei</i>	Celite-545	Acetato de isoamilo	<i>n</i> -heptano	Esterificação	Dheeman et al. (2011)
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	Accurel EP-100	Oleato de etila	<i>n</i> -heptano	Esterificação	Baron et al. (2011)

TABELA 3 - EXEMPLOS DE LIPASES IMOBILIZADAS EM SÍNTESE DE ÉSTERES (CONTINUAÇÃO)

Lipase	Suporte	Éster Produzido	Cossolvente	Reação	Referência
<i>Candida rugosa</i>	Poliuretano (Hypol FHP)	Butirato de etila	<i>n</i> -hexano	Esterificação	Pires-Cabral et al. (2010)
<i>Candida rugosa</i>	Sílica mesoporosa	Laurato de citronelila	<i>n</i> -hexano	Esterificação	Abdullah et al. (2009)
<i>Candida antarctica</i>	Resina poliacrílica	Laurato de L- ascorbila	acetonitrila	Esterificação	Chang et al. (2009)
<i>Candida antarctica</i>	Novozym 435	Laurato de cinamila	tolueno	Esterificação	Yadav e Dhoot (2009)
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	Accurel EP-100	Oleato de etila	ausência	Esterificação	Baron (2008)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Resina acrílica	Metil ésteres	ausência	Transesterificação	Hernández-Martín e Otero (2008)
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	Accurel EP-100	Oleato de etila	<i>n</i> -heptano	Esterificação	Salum et al. (2008)
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	Farelo de milho	Oleato de etila	<i>n</i> -heptano	Esterificação	Fernandes et al. (2007)
<i>Candida antarctica</i>	Resina poliacrílica	Palmitato de glucose	acetona	Esterificação	Chaiyaso et.al (2006)
<i>Candida antarctica</i>	Resina poliacrílica	3-metil-2-butanol	hexano	Transesterificação	Ottonsson et al. (2002)
<i>Candida cylindracea</i>	Accurel EP-1000	(S)- ibuprofeno	<i>n</i> -heptano	Esterificação	Chen e Tsai (2000)

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral imobilizar a lipase LipC6G9, obtida de uma biblioteca metagenômica, em diferentes suportes e caracterizá-la em meio orgânico visando futuras aplicações em biocatálise.

3.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Produzir e purificar a lipase LipC6G9 de acordo com protocolos já estabelecidos por Martini (2012);
2. Imobilizar LipC6G9 em diferentes suportes e avaliar os principais parâmetros do processo de imobilização (Eficiência da Imobilização e Retenção de Atividade);
3. Verificar a atividade de esterificação de LipC6G9 imobilizada nos diferentes suportes;
4. Avaliar a estabilidade da enzima imobilizada em solventes orgânicos e à temperatura;
5. Verificar a especificidade de LipC6G9 frente a diferentes ácidos graxos na reação de esterificação;
6. Determinar a regiosseletividade de LipC6G9 livre e imobilizada em reações de hidrólise em meio orgânico;
7. Avaliar a enantiosseletividade de LipC6G9 imobilizada na resolução cinética de um álcool secundário.

3.1.2 ESTRATÉGIA DE AÇÃO

O fluxograma apresentado na Figura 12 contém a estratégia de ação deste trabalho.

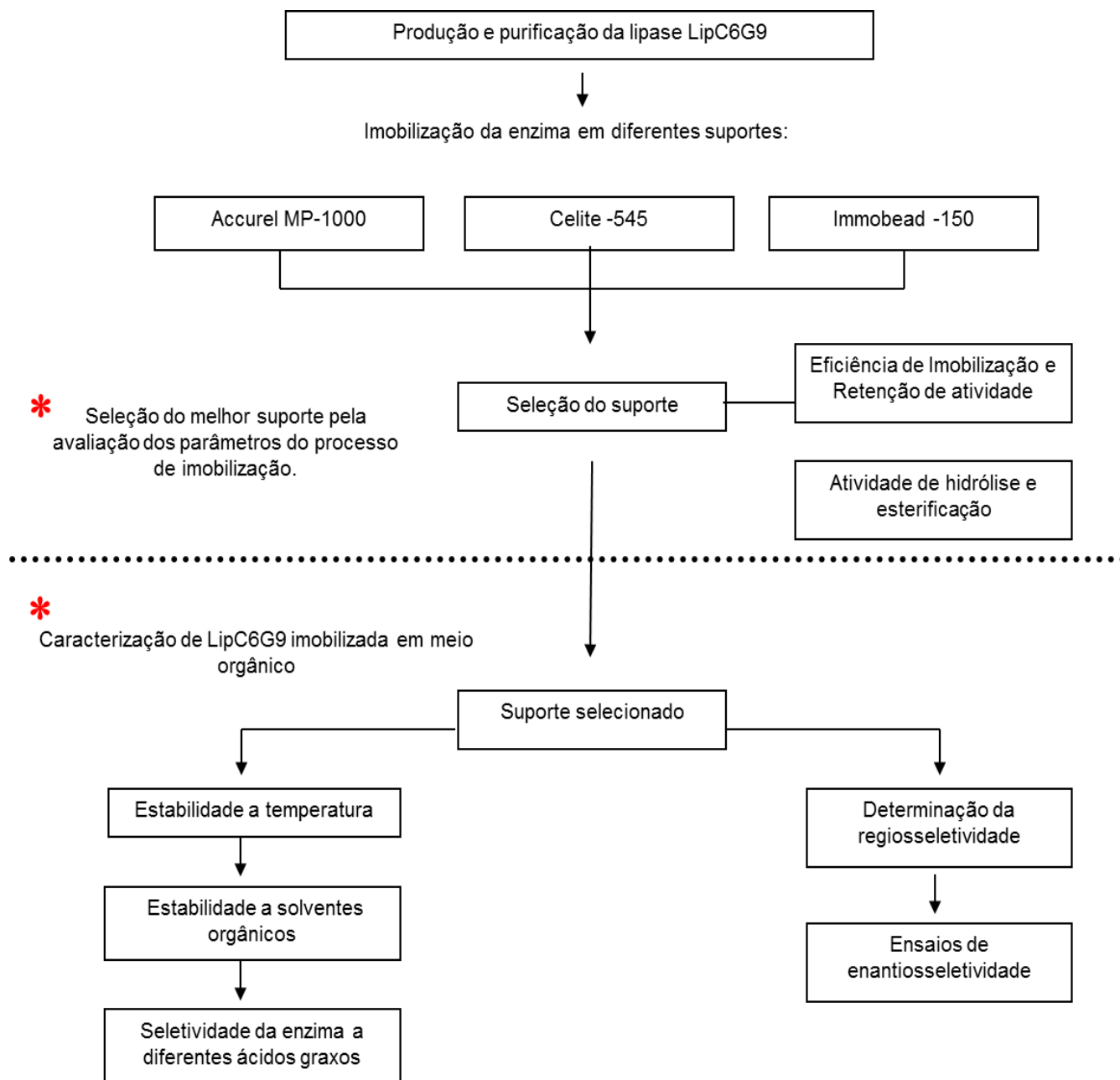


FIGURA 12 - ESTRATÉGIA GERAL DESTA TRABALHO

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental do presente trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB) do Departamento de Química, e no Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

4.1 REAGENTES, MATERIAIS E MEIOS DE CULTIVO

As estirpes de *Escherichia coli* BL21 (DE3) e os vetores pET28a(+) foram obtidos da Novagen (Madison, EUA). Os vetores pT7-7 foram obtidos da USB (Cleveland, Ohio, EUA). O reagente IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) foi adquirido da Invitrogen Life Technologies (EUA). Para a purificação da enzima foi utilizada a coluna HiTrap Chelating HP de 5 mL obtida da GE Life Sciences (Uppsala, Suécia). Os substratos trioleína (C18, 65%), tricaprilina (C8, 99%), ácido caprílico (99%), ácido láurico (99%), ácido mirístico (99%), ácido palmítico (99%), ácido esteárico (99%), ácido oleico (99%) e ácido linoleico (99%) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Os solventes orgânicos utilizados foram adquiridos da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil). Os demais reagentes foram de grau analítico e tiveram o grau de pureza requerido no experimento.

O meio de cultivo utilizado para o crescimento das estirpes de *E. coli* foi o meio Luria Bertani (LB) (triptona 10 g L⁻¹, extrato de levedura 5 g L⁻¹, NaCl 10 g L⁻¹) preparado segundo Sambrook et al. (1989).

4.2 LIPASE LIPC6G9

Como detalhado na sessão 2.1.4, a co-expressão pET28a(+)-lipC6G9trunc e pT7-7-lifC6G9trunc correspondente à lipase complexada com sua foldase Lip-LifC6G9 foi selecionada, purificada e caracterizada por Martini (2012). Neste trabalho, esta mesma co-expressão foi utilizada e a lipase produzida com a sua

foldase foi referida como lipase LipC6G9. A Figura 13 apresenta a estratégia de ação desenvolvida por Martini (2012) para obtenção da lipase LipC6G9.

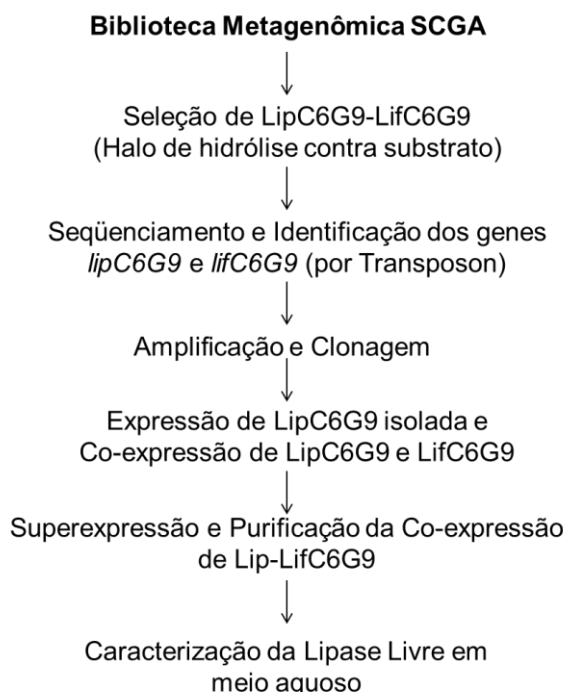


FIGURA 13 - ESTRATÉGIA DE AÇÃO DESENVOLVIDA POR MARTINI (2012) PARA OBTENÇÃO DA LIPASE LIPC6G9

4.3 SUPEREXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA LIPASE LIPC6G9

A lipase LipC6G9 foi superexpressa e purificada de acordo com a metodologia estabelecida por Martini (2012). Para tanto, células de *E. coli* BL21 (DE3), transformadas com os plasmídeos pET28a e pT7-7 contendo os genes *lipC6G9* e *lifC6G9*, foram inoculadas em 10 mL do meio LB contendo os antibióticos canamicina $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Km^{50}) e ampicilina $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Amp^{100}), e cultivadas em agitador orbital a 180 rpm, a 37°C . Após 24 h, 2 mL deste pré-inóculo foram divididos entre 4 Erlenmeyers de 2 L, contendo 500 mL de meio LB com $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ Amp^{100} e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ Km^{50} e incubados a 37°C até uma DO_{600} de 0,5. Em seguida, a cultura foi induzida pela adição de IPTG $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ durante 16 h a 20°C . Após a indução, a cultura foi coletada por centrifugação a $4.700\times g$ a 4°C por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspensionado em 35 mL de

tampão de lise (50 mmol L⁻¹ de Tris-HCl pH 7,5, 500 mmol L⁻¹ de NaCl, 10 mmol L⁻¹ de imidazol, 10 mmol L⁻¹ de β-mercaptoetanol, 2 mmol L⁻¹ de CaCl₂, 1% de Triton X-100 (v/v) e 10% (v/v) glicerol). As células foram lisadas por ultrassom em banho de gelo (15 ciclos de pulsos de 20 s, com intervalos de 30 s) com um sonicador (SONICATOR® XL 2020). O extrato bruto foi então centrifugado (15.000×g por 30 min) a 4 °C para sedimentar os restos celulares. Em seguida, o sobrenadante foi armazenado em tubo tipo Falcon para posterior purificação da enzima.

A lipase foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel (HisTrap™) no equipamento cromatográfico de fase líquida (HPCL/FPLC) AKTA pH/C-900 (GE Healthcare, EUA). O sobrenadante contendo a proteína com cauda de histidina foi injetado na coluna previamente carregada com íons Ni²⁺. Em seguida, a coluna foi lavada com cinco volumes de tampão de lise e ainda com cinco volumes de tampão de eluição (50 mmol L⁻¹ de Tris-HCl pH 7,5, 500 mmol L⁻¹ de NaCl, 1 mol L⁻¹ imidazol, 10 mmol L⁻¹ de β-mercaptoetanol, 1% de Triton X-100 e 10% (v/v) glicerol). A eluição da proteína foi monitorada a 280 nm e as frações com a proteína de interesse foram selecionadas por eletroforese SDS-PAGE (item 4.6.1). As frações contendo a lipase foram reunidas e dialisadas por 12 h em tampão (50 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 7,5, 150 mmol L⁻¹ NaCl e 20% (v/v) de glicerol), de modo a retirar todo o imidazol das amostras. A dosagem da concentração de proteínas da enzima purificada foi realizada utilizando o kit BCA (item 4.6.2). A enzima purificada foi armazenada a 4 °C para posterior imobilização.

4.4 ESTUDOS DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPC6G9

4.4.1 Seleção do Suporte

Esta etapa do trabalho teve por objetivo avaliar diferentes materiais para a imobilização de LipC6G9. Foram escolhidos três diferentes suportes com propriedades distintas em relação à forma de interação com a enzima (Tabela 4). Para os suportes Accurel MP-1000 e Celite-545, o processo de imobilização ocorre por adsorção física (interações hidrofóbicas, hidrofílicas ou ligações de hidrogênio)

(VILLENEUVE et al., 2000). Quanto ao suporte Immobead-150, a interação se deve a ligação covalente entre grupos funcionais do suporte (epóxi-etano) e da enzima (GUISÁN et al., 2001).

TABELA 4 - PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS SUPORTES EMPREGADOS PARA A IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE LIPC6G9

Suporte	Composição	Características
Accurel MP-1000	Polipropileno	Hidrofóbico Área de superfície (m/g2) 55,985 Tamanho das partículas (μm) < 1500 Porosidade das partículas 0,70
Immobead -150	Poliacrílico	Polar Grupo funcional – Epóxido Tamanho das partículas (μm) 150 a 300
Celite - 545	Sílica porosa	Polar, Tamanho das partículas (mm) 0,02-0,1

Fonte: Chiralvision (2013); Al-Duri e Yong (2000); Adlercreutz, (2000).

4.4.1 1 Imobilização em Accurel MP-1000

LipC6G9 foi imobilizada por adsorção física em Accurel MP-1000 de acordo com Al-Duri e Yong (2000). O suporte foi umedecido com solução de etanol (50% em água, v/v) por 30 min, posteriormente lavado com água destilada e filtrado. Esse procedimento teve por finalidade excluir o ar contido nas partículas. Em seguida, em um Erlenmeyer de 25 mL, foram adicionados 0,1 g do suporte e 10 mL da solução enzimática na razão de 5 mg de proteína por grama de suporte, como previamente definido por Martini (2012). Esta mistura foi incubada em agitador orbital a 150 rpm a 4 °C por 48 h. Após o processo, o derivado imobilizado foi removido da mistura por filtração em papel de filtro qualitativo, seco em dessecador por 16 h e armazenado a 4 °C.

4.4.1.2 Imobilização em Celite-545

Para a imobilização de LipC6G9 em Celite-545 foi utilizada a metodologia descrita por Kumar et al. (2011) com adaptações. O suporte foi lavado três vezes com tampão (Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹, pH 8,5) para remover as impurezas solúveis. Em seguida, este foi recuperado por filtração a vácuo em papel filtro, sendo 0,1 g ressuspenso em 10 mL da solução enzimática (razão 5 mg de proteína g⁻¹ de suporte). Esta mistura foi incubada em agitador orbital a 4 °C, 150 rpm. Após o processo, o derivado imobilizado foi removido da mistura por filtração em papel de filtro qualitativo, seco em dessecador por 16 h e armazenado a 4 °C.

4.4.1.3 Imobilização em Immobead -150

O procedimento para imobilização em Immobead-150 foi realizado de acordo com o método convencional utilizado em suportes com grupos epóxido (KNEZEVIC et al., 2006). Este método envolve o contato direto entre a enzima e o suporte sem nenhum pré-tratamento. A imobilização ocorre através dos grupos epóxido livres do suporte por ligações covalentes com aminoácidos específicos da enzima.

Para tanto, em um Erlenmeyer de 25 mL, foi adicionado 0,1 g do suporte e 10 mL da solução enzimática (razão 5 mg de proteína g⁻¹ de suporte). Esta mistura foi então incubada em agitador orbital a 150 rpm a 4 °C. Após o processo, o derivado imobilizado foi removido da mistura por filtração em papel de filtro qualitativo, seco em dessecador por 16 h e armazenado a 4 °C.

4.4.1.4 Cinética de Imobilização

Com o objetivo de acompanhar o processo de imobilização, foi realizada uma cinética para determinar o melhor tempo de contato entre a enzima e os suportes estudados. Para tanto, alíquotas (0,3 mL) foram coletadas do sobrenadante ao longo

do tempo (0-48h), sendo a atividade e a concentração residual de proteínas mensuradas pelo método titulométrico (item 5.4.1) e kit BCA (item 5.4.2), respectivamente. A partir dos resultados experimentais, os valores de eficiência da imobilização (E) e retenção da atividade (R), foram calculados a partir das Equações 4.1 e 4.2, respectivamente (YADAV e JADHAV, 2005).

$$E = \frac{(At_i - At_f).100}{At_i} \quad (4.1)$$

$$R = \frac{Ao.100}{A_T} \quad (4.2)$$

Onde: At_i : atividade inicial total de hidrólise antes da imobilização; At_f : atividade final total de hidrólise no sobrenadante após a imobilização; Ao : atividade observada do imobilizado ($U\ g^{-1}$ do suporte); A_T : atividade teórica do imobilizado ($U\ g^{-1}$ do suporte).

Para o cálculo da eficiência (E), foi considerada a atividade inicial e final do sobrenadante frente à reação de hidrólise em meio aquoso. A retenção da atividade (R) foi determinada pela atividade de hidrólise da enzima imobilizada em meio orgânico (item 4.5.1), comparando-se a atividade teórica, obtida através do balanço de massa expresso em atividade ($U\ g^{-1}$ de suporte), com a diferença de atividade encontrada do sobrenadante no início e no fim do processo de imobilização.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DE LIPC6G9 IMOBILIZADA EM MEIO ORGÂNICO

4.5.1 Atividade de Hidrólise

Para avaliar a atividade de hidrólise em meio orgânico, foi seguido o procedimento proposto por Gonçalves (1999), com algumas modificações. Para o ensaio, foi adicionado 5 mL de meio reacional em um Erlenmeyer de 25 mL

contendo 20 mg da enzima imobilizada. O meio reacional consistiu de 4,9 mL de *n*-heptano, 70 mmol L⁻¹ de trioleína e 0,1 mL (2% v/v) de água destilada. Nos ensaios em que se utilizou a enzima em sua forma livre em tampão, foram adicionados ao meio reacional 60 µL da solução contendo a enzima (1,4 mg mL⁻¹). A esse volume foram adicionados 40 µL de água destilada, completando assim 2% (v/v) de água no meio reacional.

A reação foi realizada sob agitação de 180 rpm, a 40 °C e, em intervalos fixos, alíquotas de 100 µL foram coletadas do meio reacional e analisadas quanto ao teor de ácido graxo residual através método de Lowry-Tinsley (item 4.6.4). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de promover a produção de 1 µmol de ácidos graxos por min nas condições do ensaio.

4.5.2 Estabilidade em Solventes Orgânicos

Esta etapa do trabalho teve como finalidade avaliar a estabilidade de LipC6G9 imobilizada em solventes orgânicos com diferentes log P. Para tanto, incubaram-se 25 mg da enzima imobilizada em 1 mL de solvente por 8 h em banho termostatizado a 30 °C. Após a incubação, o material foi então removido da mistura por filtração a vácuo em papel de filtro qualitativo e seco em dessecador por 16 h, a 4 °C. A atividade residual da enzima imobilizada foi avaliada pela hidrólise em meio orgânico (4.5.1). Os solventes orgânicos utilizados foram *n*-heptano (log P 4), *n*-hexano (log P 3,5), ciclohexano (log P 3,2), tolueno (log P 2,5), *tert*-butanol (log P 1,45), *n*-butanol (log P 0,8), acetato de etila (log P 0,68), tetraidrofurano (log P 0,46), *n*-propanol (log P 0,25), acetona (log P -0,23), etanol (log P -0,31), acetonitrila (log P -0,33), metanol (log P -0,76) e dimetilsulfóxido (log P -1,3).

4.5.2 Estabilidade à Temperatura

A termoestabilidade da enzima livre e imobilizada foi avaliada pela incubação em banho termostatizado por 8 h em diferentes temperaturas (de 30 a 60 °C). Para o

ensaio com a enzima livre, 50 μL (0,045 mg) foram incubados em 250 μL de tampão (50 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 7,5, 150 mmol L^{-1} NaCl, 2 mmol L^{-1} CaCl_2) e a atividade residual foi avaliada pelo método titulométrico (item 4.6.3).

Quanto à enzima imobilizada, foram incubados 20 mg em 1 mL de *n*-heptano para evitar a dessorção da enzima do suporte. Após a incubação, foi realizado o mesmo procedimento descrito no item 4.5.2 para a secagem do suporte. Atividade residual da enzima imobilizada foi avaliada pela hidrólise da trioleína em meio orgânico (4.5.1).

4.5.3 Atividade de Esterificação

O desempenho (atividade e conversão em éster) de LipC6G9 na síntese de ésteres foi avaliado utilizando como reação padrão a síntese do oleato de etila. As reações foram realizadas em agitador orbital com Erlenmeyers de 25 mL, contendo 5 mL *n*-heptano, 100 mg de enzima imobilizada, 70 mmol L^{-1} de ácido oleico e 210 mmol L^{-1} de etanol, 40 °C, 200 rpm (FERNANDES et al., 2007).

Em intervalos fixos, alíquotas de 100 μL foram coletadas do meio reacional e analisadas quanto ao teor de ácido graxo residual, através método de Lowry-Tinsley (item 4.6.4). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que promove o consumo de 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$ de ácido graxo nas condições do ensaio. Foram realizados também controles com a adição dos suportes sem a lipase.

4.5.4 Especificidade ao Substrato

Em outro conjunto de experimentos, foi avaliada a especificidade de LipC6G9 imobilizada frente a diferentes ácidos graxos saturados e insaturados de cadeia meia e longa na reação de esterificação. As reações foram realizadas de acordo com o item 4.5.3. Os ácidos graxos utilizados foram: caprílico (C8:0), láurico (C12:0),

mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1) e linoleico (C18:2).

4.5.5 Determinação da Regiosseletividade

Para determinar regiosseletividade de LipC6G9, foi realizada uma reação de hidrólise utilizando trioleína pura (99%) como substrato e os produtos oriundos da hidrólise foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) (SUGIHARA et al., 1992) e seus valores de R_f comparados com os padrões 1(2)-monoleína, ácido oleico, 1,2(2,3)-dioleína, 1,3-dioleína e trioleína (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). O meio reacional foi composto de 5 mL de *n*-heptano, 20 mmol L⁻¹ de trioleína, 0,1 mL (2%, v/v) de água destilada. A reação foi iniciada por adição de 30 mg da enzima imobilizada ou 50 µL (0,07 mg) da enzima livre. A mistura foi mantida em agitador orbital a 180 rpm, a 30 °C, durante 30 min. Após a reação, alíquotas do meio reacional (2 µL) foram aplicadas em uma placa de sílica gel (60 GF) (Fluka, Alemanha). A corrida foi realizada com uma mistura 95:4:1 (v/v) de clorofórmio, acetona e ácido acético. Para o desenvolvimento das bandas foi utilizada uma câmara saturada com iodo gasoso.

4.5.6 ENSAIOS DE ENANTIOSSELETIVIDADE UTILIZANDO LIPC6G9

4.5.6.1 Síntese dos substratos

A síntese dos substratos (*R,S*) 1-fenil-1-etanol e (*R,S*) acetato de 1-feniletila (Figura 13) foi realizada no Laboratório de Ecologia Química e Síntese de Produtos Naturais do Departamento de Química desta Universidade, sob orientação do Prof. Dr. Leandro Piovan, colaborador neste trabalho. A utilização destes substratos deve-se ao fato de que são considerados padrões para o teste de enantiosseletividade de lipases, pois apresentam as características estruturais da regra de Kazlauskas que

leva em consideração o volume dos substituintes ao redor do centro de quiralidade a ser resolvido (KAZLAUKAS et al., 1991).

Em resumo, foi realizada uma redução com NaBH_4 de uma acetona aromática (**1**) para obtenção de (*R,S*) 1-fenil-1-etanol (**2**). Após a síntese do álcool, foi realizada uma reação de esterificação utilizando anidrido acético como doador acila e piridina como catalisador, obtendo-se assim o éster (*R,S*) acetato de 1-feniletila (**3**) (Figura 14). Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna de sílica gel (0,035 -0,07 mm, 6 nm) utilizando hexano/acetato de etila (9:1) como eluente. Os compostos foram analisados e confirmados por análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/MS) e ressonância magnética nuclear (RMN) por Costa (2012).

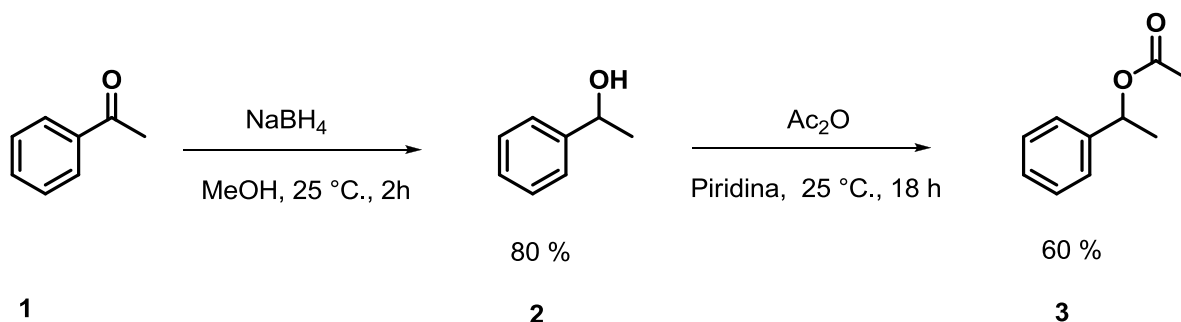


FIGURA 14 - ESQUEMA GERAL DE SÍNTESE DOS SUBSTRATOS PARA A DETERMINAÇÃO DA ENANTIOSSELETIVIDADE DE LIPC6G9

A partir do composto acetofenona (**1**) foi realizada uma redução com NaBH_4 formando o produto de interesse (**2**) 1-fenil-1-etanol. A partir do composto (**2**), foi realizada uma reação de esterificação utilizando anidrido acético como doador acila e piridina como catalisador, obtendo-se o éster (**3**) acetato de 1-feniletila.

4.5.6.2 Resolução Cinética dos Substratos (*R,S*) 1-fenil-1-etanol e (*R,S*) acetato de 1-feniletila Utilizando LipC6G9 Imobilizada

A avaliação da enantiosseletividade de LipC6G9 se deu por meio de reações de transesterificação de 1-fenil-1-etanol e da hidrólise do éster análogo, o acetato de acetato de 1-feniletila. Em um procedimento padrão, as reações foram realizadas em vials de vidro de 4 mL com tampa. Para as reações de transesterificação, o meio reacional foi composto de 1 mL de *n*-hexano, 1 mmol do substrato (*R,S*) 1-fenil-1-etanol, 4 mmol de acetato de vinila e 100 mg de enzima imobilizada (Figura 15). Nas reações de hidrólise, 1 mmol do substrato (*R,S*) acetato de 1-feniletila foi adicionado

em 1 mL de *n*-hexano contendo 2% de água (v/v). Todas as reações foram realizadas a 30 °C em agitador orbital a 150 rpm e acompanhadas ao longo do tempo pela retirada de alíquotas (10 µL), analisadas por cromatografia em fase gasosa com coluna quiral (item 4.6.5).

As configurações absolutas dos enantiômeros foram determinadas de forma indireta pela comparação com os resultados da resolução cinética enzimática utilizando a lipase comercial de *Candida antarctica* B (CAL-B, Novozymes, Bagsvaerd, Denmark), que é uma enzima descrita na literatura que segue a regra de Kazlauskas, para a enantiosseletividade em relação a álcoois secundários (*R*) (HABULIN et al., 2009; OVERMEYER et al., 1999; ALMEIDA et al., 1998).

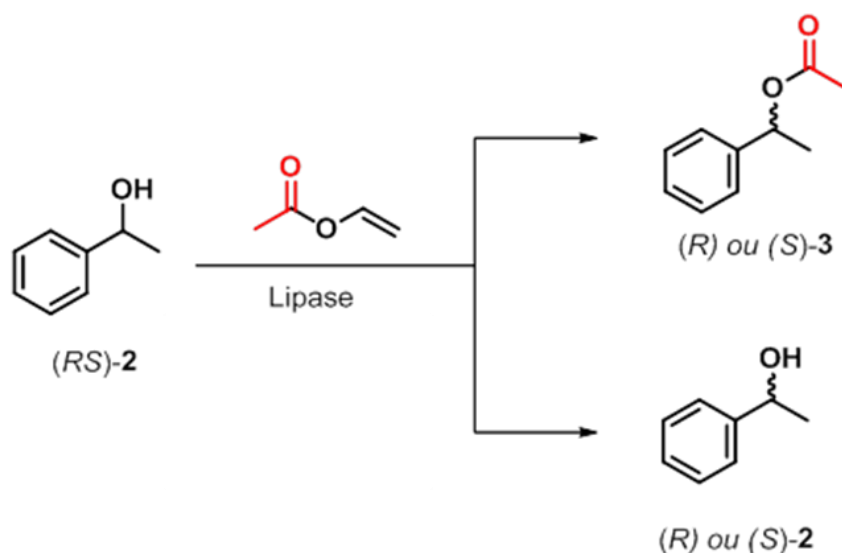


FIGURA 15 - TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÁLCOOL 1-FENIL-1-ETANOL (2) CATALISADA PELA LIPASE LIPC6G9

Os excessos enantioméricos de substrato (ee_s) e produto (ee_p) foram determinados pela diferença de porcentagens relativas de cada enantiômero, conforme Equação 4.1, onde R é a concentração do enantiômero (*R*) e S é a concentração do enantiômero (*S*).

$$ee (\%) = [(R-S) / (R+S)] * 100 \quad (4.3)$$

A conversão (c) foi calculada pela Equação 4.2 e a coeficiente enantiomérico (E) pela Equação 4.3, segundo Chen et al. (1982).

$$c (\%) = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \times 100 \quad (4.4)$$

$$E = \frac{\ln[(1 - c)(1 - ee_s)]}{\ln[(1 - c)(1 + ee_s)]} \quad (4.5)$$

onde ee_s corresponde ao excesso enantiomérico do substrato (%), ee_p corresponde ao excesso enantiomérico do produto (%), c corresponde à conversão (%) e E é o coeficiente enantiomérico, que define a enantiosseletividade da enzima.

4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.6.1 Eletroforese SDS-PAGE

A eletroforese desnaturante de proteínas (SDS-PAGE) foi realizada para acompanhar o processo de purificação e selecionar as frações eluídas contendo LipC6G9. Foi utilizado o método descrito por Laemmli (1970), usando o gel de empilhamento de 5% (m/v) e o gel de separação de 12% (m/v) (acrilamida 40%, bisacrilamida 1,6%). Amostras do extrato bruto e das frações eluídas foram aquecidas a 100 °C por 5 min e submetidas à eletroforese, aplicando-se 10 µL em cada poço.

A corrida foi realizada em um equipamento Mini-PROTEAN® (Bio-Rad), por 60 min a 180 V. Em seguida, o gel foi corado com azul brilhante de Coomassie R-250 (0,05%, m/v) e revelado com uma mistura de metanol: ácido acético: água (5/1/4, v/v). Os marcadores de massa molecular utilizados foram: fosforilase b (97

kDa), BSA (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -La (14,4 kDa) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA).

4.6.2 Determinação de Proteínas

A concentração de proteínas do extrato bruto e das frações eluídas após a purificação, e nos ensaios que se fez necessário à quantificação de proteínas, foi determinada através do método de Smith et al. (1985) ou método do ácido bicinonínico (BCA), utilizando o kit “Pierce BCA Protein Assay” (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA) tendo albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

4.6.3 Método Titulométrico (pH-Stat)

A metodologia proposta por Stuer, Jaeger e Winkler (1986) baseia-se na titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima a partir dos triacilgliceróis, utilizando um titulador automático do tipo pHStat (Metrohm 718 Stat Titrino).

Para todos os ensaios, foi preparada uma emulsão com goma arábica (3%, m/v), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2 mmol L⁻¹), tampão Tris-HCl (2,5 mmol L⁻¹, pH 8,0) e NaCl (150 mmol L⁻¹) (TISS, CARRIERE e VERGER, 2001). A esta emulsão foram adicionados os substratos tricaprilina (63 mmol L⁻¹) ou trioleína (62 mmol L⁻¹). Esta mistura foi homogeneizada durante 15 min em liquidificador. A enzima foi adicionada em 20 mL de emulsão no próprio frasco de reação (capacidade de 50 mL e termostatizado) sob agitação magnética (300 rpm), 30 °C, pH 8,0 (MARTINI, 2012) e seguida por 5 min. Uma unidade de atividade lipolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de promover a produção de 1 μmol de ácidos graxos por min nas condições do ensaio.

4.6.4 Método de Lowry-Tinsley

O método de Lowry-Tinsley (1976) foi utilizado para quantificar o teor de ácido oleico durante as reações de síntese do oleato de etila e de hidrólise da trioleína em meio orgânico. O ensaio foi realizado em *ependorfs* contendo 1,15 mL de tolueno e o reativo de cor (250 μ L), que consiste em uma solução aquosa de acetato de cobre II (5%), com pH (6,0-6,2) corrigido previamente com piridina. Adicionaram-se 100 μ L da amostra e a mistura foi agitada em vórtex durante 40 seg e a absorbância da fase orgânica lida em espectrofotômetro a 715 nm.

A concentração de ácido graxo no meio é relacionada à absorbância pela curva de calibração feita com o ácido oleico (Sigma, pureza 90%), que foi obtida nas mesmas condições do ensaio. Nas reações de hidrólise, a atividade foi calculada a partir da liberação dos ácidos graxos no meio reacional e uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de promover a produção de 1 μ mol de ácidos graxos por min nas condições do ensaio. Nas reações de esterificação, a atividade é calculada a partir do consumo dos ácidos graxos no meio reacional e uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que promove o consumo de 1 μ mol de ácidos graxos por min nas condições do ensaio.

4.6.5 Cromatografia em Fase Gasosa em Coluna Quiral

O cromatógrafo gasoso utilizado foi GC-2010 (Shimadzu Co., Kyoto, Japan), equipado com detector de ionização de chama (FID) e com coluna quiral de fase estacionária de β -ciclodextrina,(CP Chirasil-DEX CB), com dimensões de 25 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de diâmetro de partícula. As condições cromatográficas foram: injeção (1 μ L) modo split (razão 1:50), temperatura do detector 220 $^{\circ}$ C, gás de arraste nitrogênio, N₂, com gradiente de temperatura entre 110 e 120 $^{\circ}$ C, a 1 $^{\circ}$ C min⁻¹.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LIPASE LIPC6G9

Para a produção e purificação de LipC6G9 foi utilizada a metodologia estabelecida por Martini (2012). Células de *E. coli* BL21 transformadas com os plasmídeos pET28a-*lipC6G9* e pT7-7-*lifC6G9* foram cultivadas em meio LB e induzidas por 16 h a 20 °C. A purificação da lipase foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. A lipase, que possui cauda His, liga-se à coluna de afinidade e é então eluída complexada com sua foldase (sem cauda His) com tampão (Tris-HCl, pH 7,5) com concentrações crescentes de imidazol. A Figura 16 apresenta a eletroforese SDS-PAGE do extrato bruto e das frações eluídas durante o processo de purificação. Neste gel, a lipase LipC6G9 corresponde à banda de 32 kDa e a foldase LifC6G9, à banda de 23 kDa, como demonstrado por Martini (2012). Observa-se que a purificação é parcial (linhas 4 a 12) e que aparecem as bandas correspondentes à lipase e à foldase, mostrando que as duas proteínas permanecem complexadas após o processo de purificação.

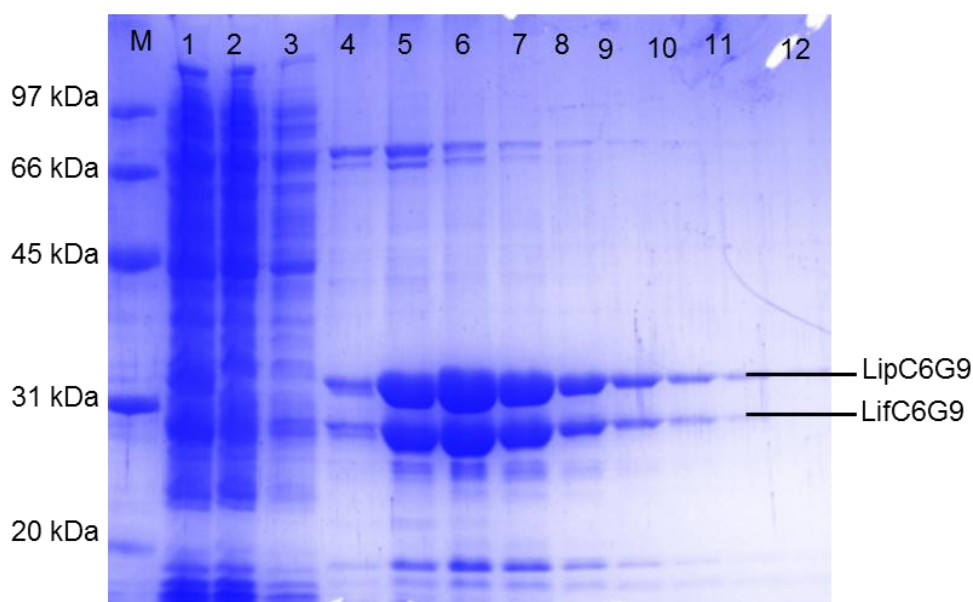


FIGURA 16 - GEL SDS-PAGE DAS FRAÇÕES ELUÍDAS DURANTE PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DA LIPASE LIPC6G9

Linhas: M) marcadores de massa molecular; 1) fração solúvel; 2) precipitado; 3) fração após injeção na coluna de níquel (lavagem); 4-12) frações eluídas durante a purificação.

Após o processo de purificação, as frações eluídas foram agrupadas e submetidas à dialise em tampão contendo 20% de glicerol na ausência de imidazol. Em seguida, a concentração de proteínas foi determinada e ensaios de atividade foram realizados. Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 5. A enzima foi parcialmente purificada com um rendimento de 40% e um fator de purificação de 12 vezes. A atividade específica da enzima foi de 2616 U mg^{-1} contra tricaprilina e 911 U mg^{-1} utilizando trioleína como substrato.

TABELA 5 - PURIFICAÇÃO DA LIPASE LIPC6G9 POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

Etapa	Volume (mL)	Proteína Total ^a (mg)	Atividade Total ^b (U)	Atividade Específica (U.mg ⁻¹)	Fator de Purificação ^c	Rendimento de Atividade ^d (%)
Extrato Livre de células	35	197	43550	221	1	100
Cromatografia de afinidade	9	6,7	17650	2616	12	40

^a A determinação de proteína foi estimada utilizando o kit Pierce BCA Protein Assay.

^b Uma unidade de atividade (U): 1 μmol de ácido graxo liberado por min, utilizando tricaprilina como substrato.

^c O fator de purificação foi calculado pela relação da atividade específica final contra a atividade específica inicial no extrato livre de células.

^d O rendimento de atividade foi calculado pela relação da atividade final contra a atividade total inicial no extrato livre de células.

Ensaio de atividade em meio orgânico foram realizados com a enzima livre em tampão e liofilizada na forma de pó, utilizando trioleína como substrato. Nesses ensaios, a enzima liofilizada não apresentou atividade e a enzima livre em tampão apresentou uma atividade específica de 26 U mg^{-1} . Este valor obtido é aproximadamente 35 vezes menor quando comparado à atividade obtida em meio aquoso (911 U mg^{-1}). Em geral, a atividade enzimática é menor em meio orgânico do que em meio aquoso. Normalmente, esse resultado é atribuído à desnaturação e à limitada flexibilidade conformacional da enzima em solventes anidros, além da formação de agregados no meio reacional. A formação desses agregados leva a problemas difusionais e, conseqüentemente, a enzima não entra em contato com o substrato, e a catálise não ocorre (KLIBANOV, 2001; KLIBANOV, 1997).

Devido à baixa atividade apresentada por LipC6G9 em sua forma livre em meio orgânico, estudos de imobilização foram realizados.

5.2 ESTUDOS DE IMOBILIZAÇÃO

5.2.1 Seleção do Suporte para Imobilização

O principal objetivo desta etapa do trabalho foi selecionar um suporte para a imobilização de LipC6G9 para sua posterior caracterização em meio orgânico. Foram escolhidos três diferentes suportes com propriedades distintas em relação à forma de interação com a enzima como descrito na Tabela 4 (pag.54). Para avaliação, foram investigados os principais parâmetros do processo de imobilização (eficiência de imobilização e retenção de atividade) e atividade de esterificação da enzima imobilizada nos diferentes suportes.

5.2.2 Cinética de Imobilização

Para acompanhar o processo de imobilização, foi realizada uma cinética em termos de atividade e proteína residual no sobrenadante da solução de proteína oferecida à imobilização. Para a imobilização em todos os suportes, foi utilizada a razão proteína/suporte de 5 mg g^{-1} , sendo esta proporção estabelecida com base em estudos prévios realizados por Martini (2012) para o suporte Accurel.

Considerando-se que a eficiência de imobilização (E) é calculada a partir do desaparecimento da atividade presente no sobrenadante, obteve-se a melhor eficiência de imobilização para o suporte Immobead, com $E = 90\%$ em apenas 3 h, chegando a 100% em menos de 6 h (Figura 17a). Para Accurel, E foi de 87% em 48 h (Tabela 6). O perfil de imobilização observado para Accurel se mostrou semelhante aos resultados encontrados por Martini (2012), que obteve $E = 100\%$ após 48 h. Para Celite, observou-se que ao longo de 48 h, não ocorreu mudança

significativa na atividade residual (Figura 17a) e na concentração de proteína no sobrenadante (Figura 17b), apresentando E de apenas 13%, mostrando que nestas condições praticamente não houve imobilização de LipC6G9 neste suporte (Tabela 6).

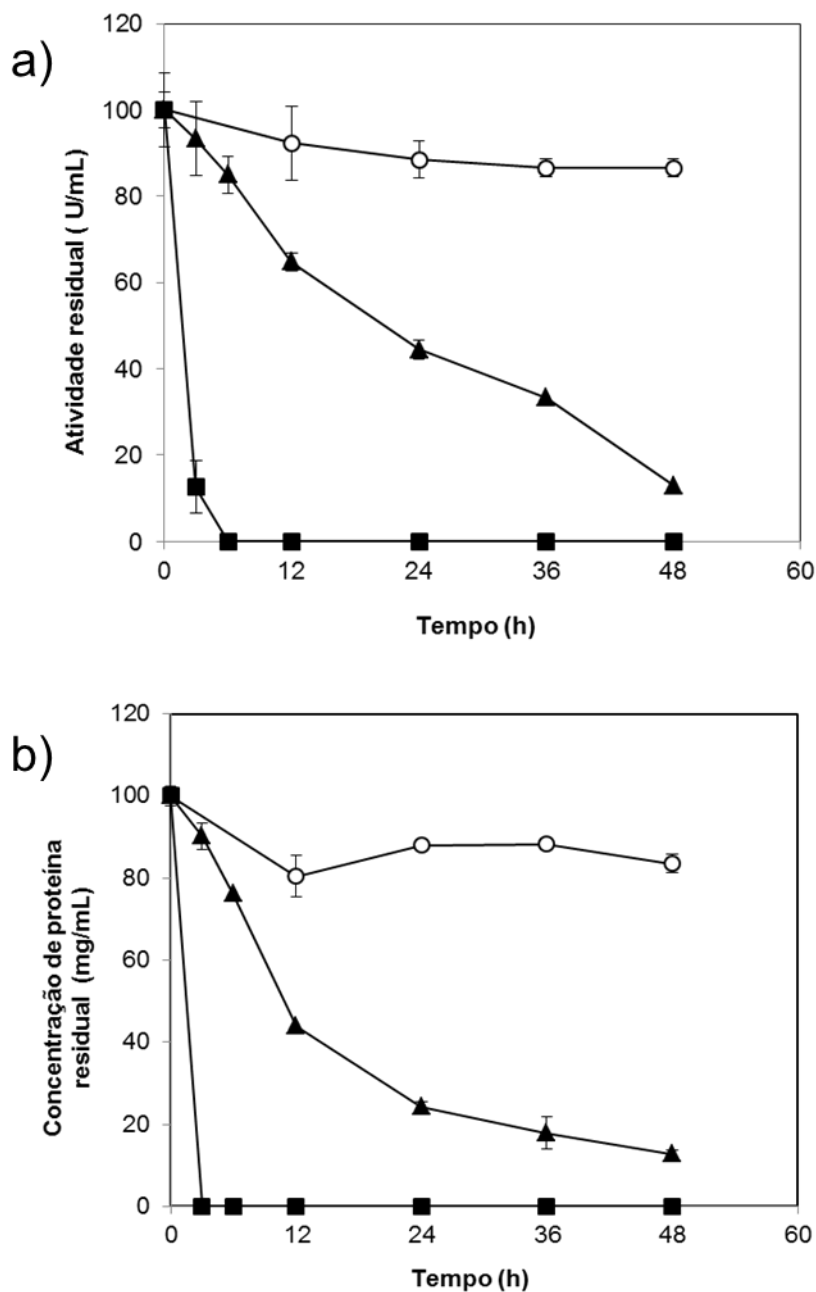


FIGURA 17 - CINÉTICA DE IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE LIPC6G9 EM TERMOS DE (a) ATIVIDADE RESIDUAL (U mL^{-1}) E (b) CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA NO SOBRENADANTE DA SOLUÇÃO OFERECIDA PARA IMOBILIZAÇÃO

(▲) Accurel MP-1000; (■) Immobead-150; (○) Celite-545. A atividade residual foi determinada pelo método titulométrico (pH-Stat) utilizando tricaprilina como substrato.

TABELA 6 - PRINCIPAIS PARÂMETROS DO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPC6G9 NOS DIFERENTES SUPORTES

Suporte	Eficiência (%)	η (%)	Atividade teórica U g^{-1} de suporte	Atividade Real U.g^{-1} de suporte em meio orgânico	R%
Accurel MP-1000	87	87	104	160	152
Celite-545	13	16	16	22	131
Immobead-150	100	100	127	26	20

Eficiência (%) – calculada por diferença entre a atividade inicial de Lip-C6G9 e a atividade final no sobrenadante após a imobilização.

Rendimento em proteína ($\eta\%$) - calculada por diferença entre concentração de proteína inicial e a concentração final no sobrenadante após a imobilização.

A atividade de hidrólise em meio orgânico foi realizada em *n*-heptano, a 40°C, 180 rpm, utilizando trioléina (70 mmol L^{-1}) como substrato.

Retenção de atividade (%) - calculada comparando-se a atividade adsorvida teórica, obtida através do balanço de massa expresso em atividade (expressa em U/g de suporte) e a atividade real da enzima imobilizada em meio orgânico.

O suporte Celite é formado por grânulos altamente porosos compostos de sílica (SiO_2) e óxidos inorgânicos (CHUN e AGATHAOE, 1989). A morfologia e o tamanho dos poros na superfície desse suporte influenciam no processo de imobilização, pois estes devem ser suficientemente grandes para acomodar a enzima e permitir livre acesso do substrato (SOARES, 2000; SOARES et al., 1999; KAGA et al., 1994). Durante a imobilização, as moléculas de enzima entram nos poros por difusão e são adsorvidas na superfície interna do suporte, diminuindo assim, o diâmetro efetivo do poro (WISDOM et al., 1984). Nesse contexto, uma hipótese a ser considerada é o fato LipC6G9 estar complexada com sua foldase e devido ao seu tamanho (aproximadamente 55 kDa), esse complexo pode estar ocupando vários sítios de ligação no suporte e dificultando ou restringindo o acesso de uma nova molécula ao suporte. Além disso, as condições do processo de imobilização devem ser consideradas, como o pH da solução e agitação do meio, pois elas influenciam na quantidade e distribuição da enzima que se liga a superfície da sílica (SOARES et al., 1999), o que pode ter contribuído para a baixa eficiência de imobilização de LipC6G9 nesse suporte.

Pode-se considerar que houve uma ótima eficiência de imobilização nos suportes Accurel e Immobead. Entretanto, o fato de ter se conseguido uma boa eficiência de imobilização não garante que a enzima esteja ativa no suporte, pois

este parâmetro mostra apenas que houve o desaparecimento da atividade no sobrenadante após a imobilização. Assim, foram realizados ensaios de atividade em meio orgânico para verificar se a enzima estava ativa após o processo de imobilização nos diferentes suportes e avaliar a retenção de atividade em relação à atividade da enzima livre. A atividade teórica da lipase foi calculada a partir da atividade da enzima livre no meio orgânico (26 U mg^{-1}) e do balanço de massa de atividade do sobrenadante no início e fim do processo de imobilização, considerando-se a atividade adsorvida no suporte, dividindo-se pela massa de suporte (g) oferecida para a imobilização. A determinação da atividade foi realizada em meio orgânico (*n*-heptano) para evitar a dessorção da enzima do suporte.

Pode-se observar na Tabela 6 que a enzima imobilizada em Accurel apresentou a maior atividade de hidrólise em meio orgânico (160 U g^{-1}), tendo sofrido ativação após a imobilização, o que é visto a partir da retenção de atividade (R) de 152%. Essa ativação pode ser justificada pela adsorção e estabilização da lipase em sua conformação estrutural aberta, uma vez que a *lid* contém resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, ou seja, a lipase estaria simultaneamente se ligando ao suporte e sofrendo ativação interfacial (PALOMO et al., 2002; BASTIDA et al., 1998). Esse tipo de imobilização permite que o sítio ativo fique exposto ao meio reacional, facilitando a entrada do substrato (FERNANDEZ LAFUENTE, 2010).

A ativação observada nesse trabalho é normalmente favorecida pela grande área superficial hidrofóbica do suporte (HANEFELD et al., 2008). Suportes hidrofóbicos têm sido reportados na literatura com bastante adequados para lipases. Isto provavelmente é devido ao seu caráter hidrofóbico em áreas em torno do sítio ativo e por este tipo de imobilização ser pouco agressivo à conformação da enzima (HANEFELD et al., 2008; MATEO, 2007; FORESTI et al., 2005).

Os resultados apresentados estão de acordo com os obtidos por Martini (2012), que imobilizou LipC6G9 em Accurel MP-1000 e relatou valores de R acima de 100% para as três concentrações de proteína oferecidas para imobilização (5, 10 e 15 mg g^{-1} de suporte). Resultados semelhantes foram obtidos para outras enzimas imobilizadas em suportes hidrofóbicos, como por exemplo, para a esterase de *Pyrococcus furiosus* imobilizada em Accurel MP-1000 (ALMEIDA et al., 2008, BRANCO et al., 2008), para a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em Accurel EP-100 (BARON, 2008), para as lipases de *Mucor miehei* e *Candida rugosa*

imobilizadas em octadecil-sepabeads (PALOMO et al., 2002) e para lipase de *Humicola lanuginosa* imobilizada em octil-agarose (BASTIDA et al., 1998).

Em relação ao suporte Celite, a baixa atividade de hidrólise (22 U g^{-1}) era esperada devido à baixa eficiência de imobilização da enzima nesse suporte (13%, Tabela 6). Também foi observado que durante a reação de hidrólise ocorreu a formação de agregados insolúveis no meio reacional. Esse fenômeno provavelmente ocorreu devido à polaridade do suporte, que é altamente hidrofílico e, em contato com água presente no meio, acarretou na formação dos agregados. A alta retenção de atividade ($R=131\%$, Tabela 6) observada pode ser explicada pela baixa eficiência de imobilização, pois a retenção é calculada a partir da atividade adsorvida teórica contra a atividade real da enzima imobilizada em meio orgânico.

Apesar de apresentar uma eficiência de imobilização de 100%, foram obtidos valores muito baixos de atividade (26 U g^{-1}) e de retenção de atividade (20%) para o suporte Immobead (Tabela 6). Assim como foi observado com o suporte Celite, também ocorreu a formação de agregados insolúveis no meio reacional. Segundo Persson et al. (2002), a formação desses agregados acarreta em um aumento dos efeitos difusionais e de transferência de massa e, conseqüentemente, uma diminuição da velocidade da reação.

Immobead-150 é um polímero acrílico comercial que promove a imobilização de enzimas por ligações covalentes entre os grupos epóxido livres e os resíduos de aminoácidos da proteína. Os grupos epóxido sofrem ataque nucleofílico de diferentes grupos da superfície da enzima como amida, tiol e radical hidroxila, permitindo interações entre a enzima e o suporte (MATEO et al., 2000). Esse processo é descrito através de dois mecanismos, onde ocorre uma rápida e suave e adsorção física da proteína sobre o suporte; em seguida, a ligação covalente ocorre entre a proteína adsorvida e grupos epóxido vizinhos (MATEO et al., 2007). No entanto, os resíduos presentes na vizinhança também têm sua reatividade influenciada pelo pH do meio. Em condições de pH neutro, por exemplo, os resíduos de lisina, os mais frequentes grupos nucleófilos da enzima, em pH neutro, apresentam um pKa de aproximadamente 10,5 e, portanto, dificilmente serão reativos (MATEO et al., 2003), enquanto que os grupamentos N-terminais da enzima são os grupos mais reativos. Nesse trabalho, o processo de imobilização foi realizado em pH 8,0 e, sendo assim, somente os grupamentos N-terminais de

LipC6G9 são reativos. Além disso, o método utilizado para imobilização da lipase nesse suporte é descrito como convencional, ou seja, não houve nenhum pré-tratamento para ativação dos grupos epóxido ou “bloqueio” dos grupos livres após o processo de imobilização. Dessa forma, podem ter ocorrido reações secundárias entre aminoácidos e os grupos epóxido livres do suporte, modificando a estrutura terciária cataliticamente ativa da lipase (KNEZEVIC et al., 2006).

A natureza do suporte (hidrofílico ou hidrofóbico) pode influenciar no processo de imobilização. Isto implica que, dependendo do suporte, ligações podem ocorrer em as áreas da superfície da proteína que têm resíduos mais hidrofóbicos ou as áreas da proteína com carga mais negativa, com diferentes efeitos sobre a atividade enzimática (MATEO et al., 2003; MATEO et al., 2007). Dessa forma, as ligações podem não ser uniformes em apenas uma região da enzima, podendo ocorrer em resíduos próximos ao sítio ativo, comprometendo a estrutura e conformação ativa da enzima, o que pode explicar os resultados obtidos neste trabalho.

5.2.3 Atividade de Esterificação de LipC6G9 Imobilizada em Diferentes Suportes

A Figura 18 apresenta o perfil da síntese de oleato de etila utilizando LipC6G9 imobilizada nos diferentes suportes e livre liofilizada. Para os ensaios, foram utilizados 100 mg da enzima imobilizada, correspondentes a 16, 2,2 e 2,6 U de atividade para Accurel, Celite e Immobead respectivamente, conforme dosagem de atividade de hidrólise em meio orgânico (item 5.2.4). Como a enzima liofilizada não apresentou atividade em meio orgânico (item 5.1), para esse ensaio foram adicionados 52 U de atividade de hidrólise em meio orgânico (valor obtido para a enzima não liofilizada, em tampão) correspondentes a 2 mg de pó.

Como se observa na Figura 18, entre os três suportes avaliados, houve apenas conversão em éster (90% em 8 h) para a lipase imobilizada no suporte Accurel. A atividade de esterificação foi calculada nos 60 min iniciais de reação e o valor obtido foi de 16 U g^{-1} de suporte. A enzima liofilizada não apresentou atividade de esterificação confirmando os resultados anteriores (item 5.1), onde foi observado que LipC6G9 liofilizada não é ativa em solventes orgânicos, provavelmente pela formação de agregados, que causam problemas difusionais.

Como a lipase imobilizada em Immobead não apresentou atividade de esterificação, a hipótese de que esses agregados estivessem influenciando na atividade de LipC6G9 imobilizada em Immobead, levantada no item acima (5.2.2) para justificar a baixa atividade de hidrólise, foi descartada ao avaliar-se o seu comportamento em reações de esterificação (Figura 18). Nessas reações, não há presença de água livre no meio reacional e consequentemente, não foi observada a formação de agregados insolúveis.

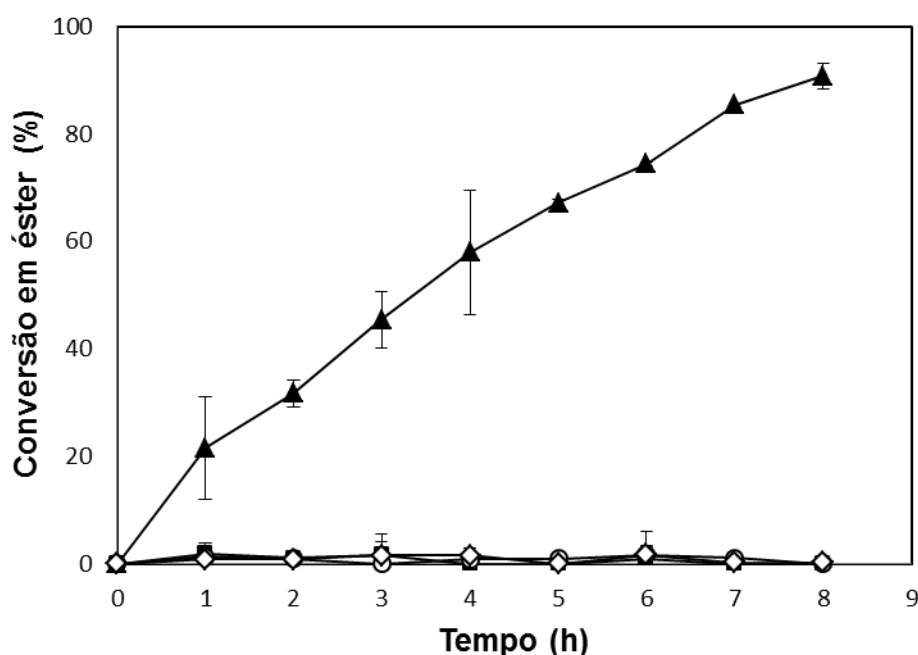


FIGURA 18 - CINÉTICA DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO CATALISADA POR DIFERENTES PREPARAÇÕES DA LIPASE LIPC6G9

(▲) Accurel MP-1000; (■) Immobead-150; (○) Celite-545; (◇) enzima liofilizada em pó.
Condições: ácido oleico (70 mmol.L^{-1}), etanol (210 mmol.L^{-1}), *n*-heptano (5 mL), 40°C , 200 rpm.

Na literatura, vários estudos têm descrito maiores rendimentos na produção de ésteres utilizando lipases imobilizadas em relação a enzimas livres liofilizadas (DHEEMAN et al., 2011; KHARRAT et al., 2011; GHAMGUI et al., 2007; PALOMO et al., 2002). De fato, a enzima, quando imobilizada, está espalhada em uma ampla área da superfície do suporte, tornando o sítio ativo da enzima mais acessível ao substrato do que quando não está imobilizada, visto que a lipase livre costuma formar agregados no meio reacional (PETKAR et al., 2006; REES e HALLING 2000),

como já mencionado anteriormente. Os resultados apresentados na literatura, em conjunto com os deste trabalho, demonstram o papel relevante do processo de imobilização na utilização de lipases em reações de síntese em meios orgânicos.

Em relação a estudos de seleção de suportes, resultados semelhantes foram reportados por Kaewthong et al. (2005) avaliando a imobilização da lipase de *Pseudomonas sp* em diferentes suportes (Celite-545, gel de sílica, CaCO_3 , Accurel EP100 e carvão ativado). Accurel EP100 foi selecionado como o melhor suporte, apresentando uma atividade específica de $0,23 \text{ U mg}^{-1}$ de suporte e uma retenção de atividade de 45%. Branco (2008) imobilizou a esterase recombinante de *Pyrococcus furiosus* (Pf2001_60) por adsorção em suportes com diferentes graus de hidrofobicidade (Accurel MP-1000, Octadecil sepabeads, Butil sepabeads e Poliestireno) de origem comercial e não comercial. A melhor retenção de atividade ($R=340\%$) foi obtida para a esterase imobilizada em Accurel MP-1000. Baron (2008) imobilizou a lipase de *B. cepacia* LTEB11 em 10 diferentes suportes com características distintas. O melhor suporte, considerando a eficiência de imobilização ($E=100$) e a retenção de atividade em meio orgânico ($R=193\%$) foi o Accurel EP 100.

Embora as condições da reação ainda não estejam otimizadas, os resultados obtidos para LipC6G9 imobilizada em Accurel (conversão de 90% em 8 h) são considerados promissores quando comparados à literatura. Peng et al. (2011) reportaram 98% de conversão na síntese de acetato de butila em *n*-heptano após 10 h de reação utilizando a lipase *P. aeruginosa* CS2 co-expressa com a foldase, imobilizada em Celite-545. Kharrat et al. (2011) utilizaram a lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em organogéis de sílica e reportaram 80% de conversão na síntese de oleato de butila em *n*-hexano em 9 h de reação. Dheeman et al. (2011) aplicaram uma nova lipase *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 imobilizada em Celite-545 na síntese de acetato de isoamila em *n*-hexano e obtiveram 34% de conversão após 72 h de reação. Salum et al. (2008) reportaram 70% de conversão em oleato de etila em *n*-heptano após 10 h de reação utilizando a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em Accurel EP 100.

Baseado nos resultados apresentados pelas diferentes preparações de LipC6G9 nas reações de esterificação (Figura 18) e nos principais parâmetros de imobilização estudados (Tabela 6), o suporte Accurel foi selecionado para a imobilização de LipC6G9 e realização das próximas etapas do trabalho.

5.2.4 Verificação da Adsorção de LipC6G9 e de LifC6G9 no Suporte Accurel MP-1000

Para confirmar a imobilização de LipC6G9 complexada com a foldase LifC6G9 no suporte Accurel, foram realizados ensaios de dessorção das proteínas do suporte utilizando uma solução de SDS 10% (m/v), seguidos de análise das amostras eluídas por SDS-PAGE (Figura 19). Pode ser observada a presença das bandas correspondentes às duas proteínas (linha 4), confirmando que a lipase é imobilizada no suporte Accurel complexada com sua foldase.

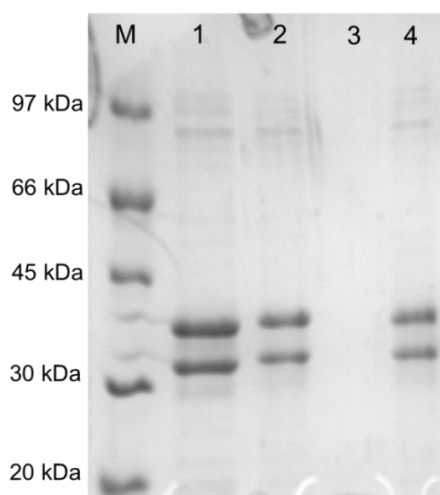


FIGURA 19 - GEL DE ELETROFORESE SDS-PAGE MOSTRANDO AS BANDAS DE PROTEÍNAS CORRESPONDENTES À LIPC6G9 E LIFC6G9 ANTES E DEPOIS DA IMOBILIZAÇÃO E APÓS DESSORÇÃO DO COMPLEXO DO SUPORTE ACCUREL MP-1000.

Linha M: marcadores de massa molecular; linha 1: LipC6G9 purificada; linha 2: sobrenadante do processo de imobilização no tempo 0 h; linha 3: sobrenadante após 48 h de imobilização; linha 4: dessorção de Lip-LifC6G9 do suporte Accurel MP-1000 utilizando solução de SDS 10%.

Na literatura, há poucos estudos envolvendo lipases complexadas com sua foldase específica. Grande parte dos trabalhos reportados envolve estratégias de expressão funcional *in vitro* e *in vivo* da lipase e foldase do gênero *Pseudomonas* (OSHIMA et al., 1993; HOBSON et al., 1993; IHARA et al., 1995; YANG et al., 2000; TRAUB et al., 2001; MADAN e MISHRA, 2010; WU et al., 2012). Em relação à estrutura, o primeiro trabalho foi reportado por Pauwels et al. (2006), onde os

autores cristalizaram e elucidaram a estrutura tridimensional da lipase de *Burkholderia glumae* complexada com sua foldase. Como já mencionado anteriormente, em relação a estudos de imobilização, o trabalho de Peng et al. (2011) é o único relatado na literatura. Os autores imobilizaram a lipase de *P. aeruginosa* CS2 co-expressa com sua foldase em Celite-545. A enzima foi aplicada na síntese de acetato de isoamila em *n*-hexano e foram obtidos 34% de conversão após 72 h, sendo reutilizada por cinco vezes sem perda de atividade. Em relação aos ensaios de estabilidade em solventes orgânicos, a enzima apresentou alta estabilidade em diferentes solventes (DMSO, acetonitrila, *n*-heptano, éter de petróleo, isooctano) comparáveis a duas lipases comerciais avaliadas na mesma condição.

Em relação a lipases oriundas a partir de bibliotecas de metagenômica, LipC6G9 é primeira que é imobilizada complexada com sua foldase.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DE LIPC6G9 IMOBILIZADA EM MEIO ORGÂNICO

5.3.1 Estabilidade em Solventes Orgânicos

A atividade e a estabilidade de lipases em solventes orgânicos é um parâmetro importante para aplicações em biocatálise, visto que a atividade enzimática é fortemente afetada pela escolha do solvente orgânico, que pode provocar a desnaturação da enzima levando à perda da atividade. Nesse trabalho, a tolerância de LipC6G9 a solventes orgânicos foi avaliada incubando-se a enzima imobilizada em solventes orgânicos polares e apolares em uma ampla faixa de log P (-1,30 a 4,0) por 8 h a 30 °C (Tabela 7). As atividades residuais de hidrólise em meio orgânico (item 4.5.1) foram calculadas em relação ao controle realizado sem pré-incubação.

LipC6G9 imobilizada mostrou-se estável em solventes polares e apolares em ampla faixa de log P, com destaque para *n*-heptano (log P 4), hexano (log P 3,5), tolueno (log P 2,5), tetrahidrofurano (log P 0,46), acetona (log P -0,31) e etanol (log

P -0,23), mantendo mais de 80% de sua atividade inicial após incubação por 8 h a 30 °C (Tabela 7).

TABELA 7 - ESTABILIDADE DE LIPC6G9 EM SOLVENTES ORGÂNICOS

Solventes Orgânicos	log P	Atividade residual (% \pm DP) ^b
Controle ^a	***	100
<i>n</i> -Heptano	4,0	89 \pm 5
Hexano	3,50	79 \pm 4
Ciclohexano	3,2	76 \pm 5
Tolueno	2,50	86 \pm 2
tert-Butanol	1,45	71 \pm 1
<i>n</i> -Butanol	0,80	76 \pm 12
Acetato de Etila	0,68	43 \pm 5
Tetraidrofurano	0,46	82 \pm 11
<i>n</i> -Propanol	0,25	63 \pm 11
Etanol	-0,23	83 \pm 2
Acetona	- 0,31	85 \pm 10
Acetonitrila	-0,33	72 \pm 8
Metanol	-0,76	30 \pm 1
DMSO	-1,30	0

^a Controle sem pré-incubação. A enzima imobilizada foi incubada em 1 mL de solvente por 8 h a 30 °C.

^b A atividade residual foi avaliada pela hidrólise da trioleína em meio orgânico. Ensaios realizados em triplicata.

O valor de log P é geralmente utilizado para correlacionar a polaridade do solvente com a atividade e estabilidade enzimática. A estabilidade em solventes orgânicos polares ($-2,5 < \log P < 0$) é uma característica incomum para a maioria das lipases, devido à capacidade desses solventes em retirar a água de solvatação da superfície da enzima, desnaturando-a. Devido a essa característica, normalmente apenas solventes com log P maiores que 2,5 são considerados biocompatíveis para atividade catalítica (KRIEGER et al., 2004; ZACKS e KLIBANOV, 1988).

Entretanto, neste trabalho, não foi observada correlação entre valores de log P e estabilidade enzimática. Resultados semelhantes foram reportados para as lipases de *A. thermoaerophilus* (MASOMIAN et al., 2010), *Pseudomonas sp.* S5 (RAHMAN et al., 2005) e *P. cepacia* (LIU et al., 2010), onde não foi observada correlação entre maior atividade e estabilidade com o aumento da polaridade (log P) dos solventes. Os resultados obtidos para LipC6G9 reforçam que a estabilidade de lipases em solventes orgânicos não é dependente somente da polaridade (log P), mas também do grupo funcional e constituição molecular do solvente orgânico (FAN et al., 2011; LIU et al., 2010; WU et al., 2007).

Visando aprofundar os estudos de efeitos de solventes orgânicos na estabilidade de lipases, Hernandez-Rodriguez et al. (2009) correlacionaram a estabilidade de duas lipases de *Rhizopus sp.* em solventes orgânicos de acordo com o grupo funcional do solvente em apolares, polares próticos e polares apróticos. Foi observada alta estabilidade lipases para solventes apolares (70 a 148%) e polares apróticos (80 a 146%) e menores que 12% para solventes polares próticos em relação ao controle. Os autores atribuíram esse resultado a interação entre os solventes polares e apróticos polares com a enzima não ter afetado o nível de hidratação da molécula, mantendo a conformação necessária para a enzima manter sua atividade.

Neste trabalho, não foi possível estabelecer esta correlação entre estabilidade e solventes apróticos, pois LipC6G9 se manteve estável em solvente polares próticos e apróticos, com exceção do metanol e do DMSO (Tabela 7), que desnaturou completamente a enzima. Isto pode ser atribuído à extração da camada de água essencial na superfície da enzima devido à extrema polaridade do DMSO (WU et al., 2007; SIMON et al., 1998). O fato de metanol ter afetado mais a estabilidade da enzima em relação aos outros álcoois aqui testados (*tert*-butanol, *n*-butanol, *n*-propanol e etanol) pode ser atribuído à sua menor cadeia, que influencia diretamente na interação solvente-proteína (YANG et al., 2012).

Está bem descrito na literatura que atividade e estabilidade de lipases em solventes orgânicos variam de acordo com a enzima (SUGIHARA et al., 1992). A alta atividade e estabilidade encontrada para LipC6G9 nesse estudo podem estar relacionadas ao fato de a lipase estar complexada com sua foldase. Esse fato pode torná-la mais rígida e menos suscetível à ação desnaturante do solvente, mantendo

sua conformação ativa. A lipase *P. aeruginosa* CS2 co-expressa com a foldase também apresentou alta estabilidade em solventes orgânicos. A enzima manteve mais de 60% de atividade residual após 9 h de incubação em diferentes solventes orgânicos (50% v/v) (DMSO, acetonitrila, clorofórmio, éter de petróleo, *n*-hexano) (PENG et al., 2011).

Recentemente, novas lipases e esterases estáveis em solventes orgânicos obtidas por metagenômica foram descritas (JIN et al., 2012; FAN et al., 2011; GLOGAUER et al., 2011; COTE e SHARECK 2010). Entretanto, esta comparação é difícil devido às diferentes condições e metodologias, como tempo incubação, temperatura, concentração e tipo do solvente utilizado (DOUKYU e OGINO, 2010). No entanto, a atividade elevada e a notável estabilidade apresentada por LipC6G9 imobilizada em 100% (v/v) de solventes polares e apolares, torna-a promissora para utilização em biocatálise em solventes orgânicos.

5.3.2 Estabilidade à Temperatura

A temperatura tem um papel significativo em processos biocatalíticos. A estabilidade da enzima frente à temperatura é um importante parâmetro para posterior aplicação em reações de esterificação e transesterificação, que geralmente são realizadas entre 30 °C e 50 °C, por períodos relativamente longos. Particularmente nas reações de transesterificação em sistemas livres de solvente, o aumento da temperatura pode reduzir a viscosidade do meio reacional, aumentar a solubilidade e o processo de difusão dos substratos. Entretanto, altas temperaturas podem comprometer a estrutura conformacional catalítica da enzima, levando à perda de atividade (FORESTI e FERREIRA, 2005). Dessa forma, torna-se importante avaliar a estabilidade da enzima ao longo do tempo. Nesse trabalho, a termoestabilidade de LipC6G9 foi avaliada incubando-se a enzima livre e a imobilizada por 8 h em diferentes temperaturas (30 °C – 60 °C) e suas atividades residuais foram mensuradas e comparadas com o controle realizado sem pré-incubação.

Como se observa na Figura 20, a enzima imobilizada manteve 100% de sua atividade após incubação a 30 °C e mais de 70% quando incubada a 40 °C e 50 °C

por 8 h. Sob as mesmas condições de incubação, a atividade da enzima livre decai aproximadamente 50% em relação ao controle após incubação até 50 °C. Após incubação a 60 °C, a enzima imobilizada mantém 50% de sua atividade original enquanto a enzima livre mantém apenas 20%.

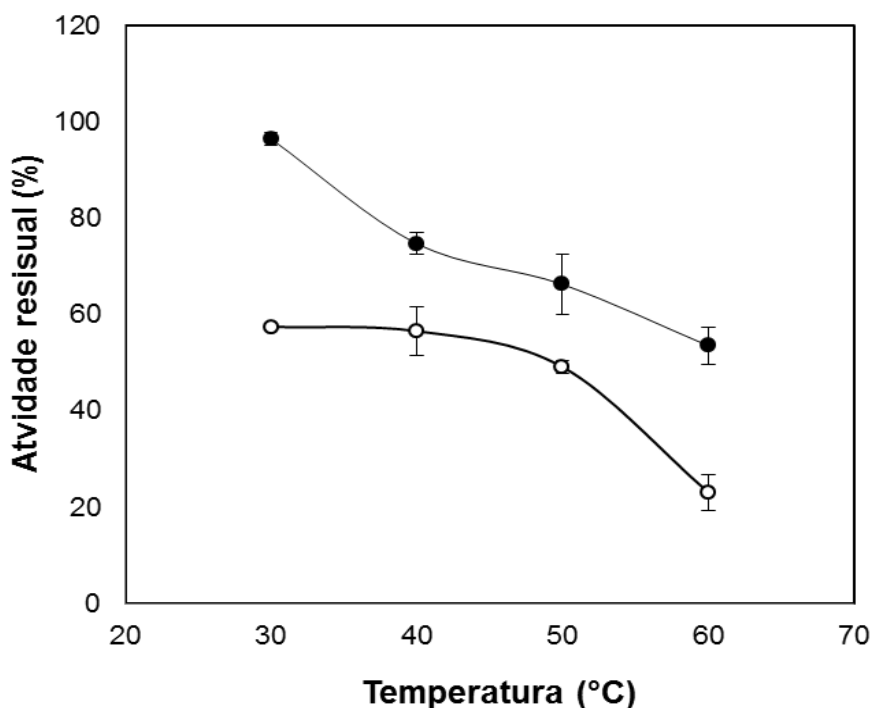


FIGURA 20 - ESTABILIDADE DE LIPC6G9 LIVRE E IMOBILIZADA EM DIFERENTES TEMPERATURAS

(○) enzima livre; (●) enzima imobilizada.

A enzima livre foi incubada em 1 mL de tampão (50 mmol.L⁻¹ Tris-HCl pH 7,5, 150 mmol L⁻¹ de NaCl, 2 mmol.L⁻¹ de CaCl₂) por 8 h. Atividade residual da enzima livre foi avaliada pelo método titulométrico (pH-Stat).

A enzima imobilizada foi incubada em 1 mL de *n*-heptano por 8 h. A atividade residual da enzima imobilizada foi avaliada pela hidrólise da trioleína em meio orgânico.

Vários trabalhos têm demonstrado maior estabilidade térmica para enzimas imobilizadas em relação às enzimas livres (BAYRAMOGLU et al., 2011; TUTAR et al., 2009; MATSUMOTO e OHASHI 2003). Em geral, esta maior estabilidade se deve às ligações entre o suporte e a enzima, que garantem uma estrutura tridimensional mais rígida, evitando a quebra das interações responsáveis por manter a conformação ativa, mesmo em temperaturas mais elevadas (YE et al., 2005, MATEO et al., 2000, BALCÃO et al., 1996). No presente trabalho, o fato de a

enzima estar em solvente orgânico na ausência de água livre também pode ter contribuído para uma maior rigidez de sua estrutura tornando-a mais resistente desnaturação térmica (KLIBANOV, 2001).

Resultados semelhantes aos obtidos nesse trabalho utilizando suportes de polipropileno foram relatados na literatura, como por exemplo, para a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em Accurel EP-100, que apresentou maior estabilidade em relação à enzima livre após 1 h de incubação (BENAIGES et al., 2010). Madalozzo (2011) avaliou a estabilidade da lipase recombinante de *R. oryzae* expressa em *Pichia pastoris* imobilizada em Accurel MP-1000 frente a diferentes temperaturas por 24 h. A enzima imobilizada se apresentou mais estável à temperatura, mantendo mais de 60% de atividade residual a 30 °C e 40 °C, enquanto a enzima na forma livre manteve apenas 20% da atividade a 30 °C, e a partir de 40 °C houve praticamente perda total da atividade. A lipase de *Pseudomonas sp.* imobilizada em Accurel EP-100 apresentou uma ótima estabilidade após incubação por 24 h na temperatura de 45 °C, mantendo 90% da atividade inicial, enquanto que a lipase livre perdeu 50% da atividade nas mesmas condições (KAEWTHONG et al., 2005).

5.3.3 Especificidade ao Substrato

Para completar a caracterização de LipC6G9, com vistas à sua aplicação na síntese de ésteres, foi determinada sua especificidade em relação ao comprimento de cadeia dos ácidos graxos nas reações de esterificação em *n*-heptano. Para tanto, foram utilizados ácidos graxos com diferentes tamanhos de cadeias (C8 a C18), saturados e insaturados. A Figura 21 apresenta o perfil de conversão e a Figura 21, as atividades de esterificação frente aos diferentes ácidos graxos nas reações de esterificação. As melhores taxas de conversão (> 95% em 3 h) foram obtidas para ácidos graxos saturados de cadeia média e longa (C8, C14 e C16), com máxima atividade (29 U g⁻¹) obtida para ácido palmítico (C16) (Figura 22).

Comportamento semelhante foi observado para a lipase de *B. cepacia* (LPS AR01520) imobilizada em suporte Accurel EP-100 (PENCREACH, 1999) e a de *P. cepacia* (LPS A001526), em sistemas de microemulsão AOT/isooctano (STAMATIS,

1993), onde elevadas taxas de conversão foram obtidas utilizando ácido palmítico como substrato. Segundo Abbas e Comeau (2003), em condições reacionais não otimizadas, a taxa de conversão tende-a aumentar rapidamente com o aumento do número de carbonos do ácido graxo. Nesse trabalho, não foi observado esta relação. Para ácidos graxos de maior cadeia (C18, C18:1 e C18:2), foram observadas atividades menores ou similares a ácidos graxos de cadeia média (Figura 22) e conversões de 90% foram obtidas após 7 h de reação.

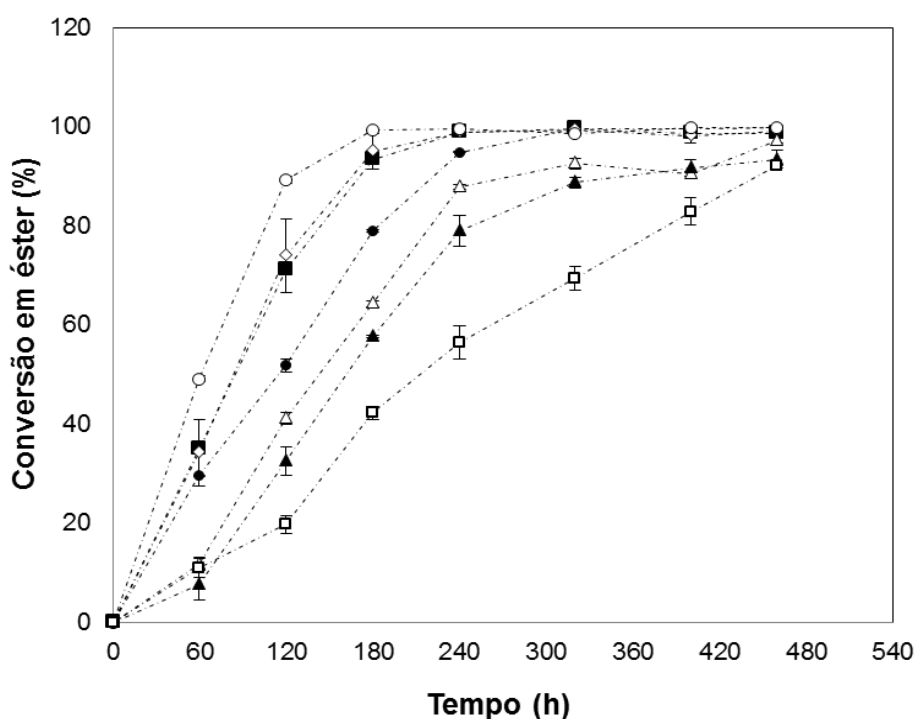


FIGURA 21 - CINÉTICA DE REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO MEDIADA PELA LIPASE LIPC6G9 IMOBILIZADA EM ACCUREL MP-1000

(■) Ácido caprílico (C8); (●) ácido láurico (C12); (◊) ácido mirístico (C14); (○) ácido palmítico (C16); (△) ácido esteárico (C18); (□) ácido oleico (C18:1); (▲) ácido linoleico (C18:2).
Condições : ácido graxo (70 mmol. L⁻¹), etanol (210 mmol. L⁻¹), lipase imobilizada (100 mg), *n*-heptano (5 mL), 40 °C, 200 rpm

A maior seletividade de LipC6G9 por ácidos graxos de cadeia média e longa saturados é similar aos resultados reportados para a maioria das lipases descritas (KAPOOR e GUPTA, 2012). Geralmente, essa maior seletividade é atribuída às interações hidrofóbicas entre o substrato e o sítio ativo da enzima (BAPTIE et al., 2010; KAPOOR e GUPTA, 2012). Assim, ácidos graxos de cadeia média e longa

saturados são mais hidrofóbicos em relação a ácidos graxos de cadeia curta e tendem a interagir mais facilmente com o sítio ativo da enzima, que é altamente hidrofóbico. Entretanto, substratos de cadeia longa saturados e insaturados podem sofrer algum tipo de impedimento estérico durante a formação do complexo acil-enzima (WU et al., 2002), como reportado por Barros et al. (1994). Os autores observaram um aumento linear nas taxas de conversão na esterificação de ácidos graxos saturados até 18 carbonos, utilizando a lipase de *Chromobacterium viscosum*. Entretanto, para os ácidos graxos de maior cadeia (C22, C22:1, C22:2) ou de 18 carbonos insaturados (C18:1, C18:2, C18:3) as taxas de conversão caíram aproximadamente 50% ou mais. Os resultados obtidos nesse trabalho corroboram essa hipótese, onde um maior tempo (7 h) foi necessário para atingir conversões de 90% para C18, C18:1 e C18:2. Isso fica mais claro na comparação entre conversões na primeira hora de reação, onde se obteve 50% de conversão para C16 enquanto que para C18, C18:1 e C18, as conversões não chegaram a 20% (Figura 21).

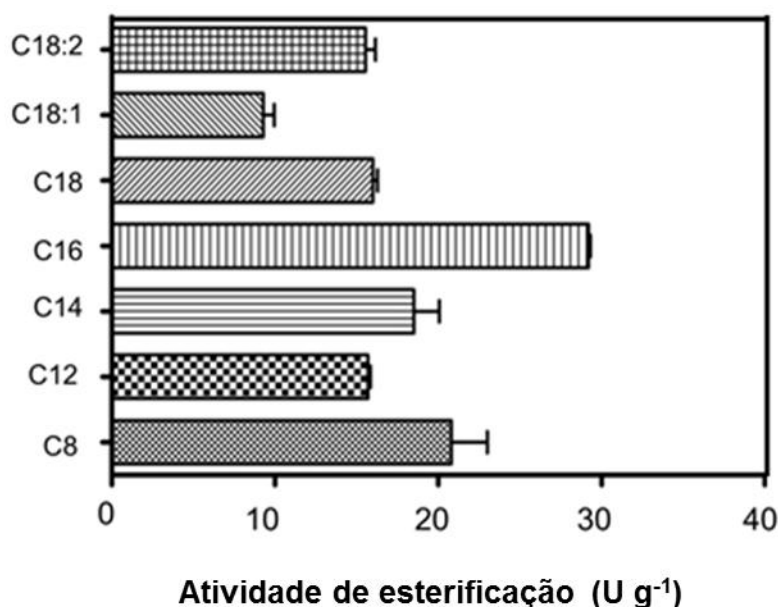


FIGURA 22 - ATIVIDADE DE ESTERIFICAÇÃO DA LIPASE LipC6G9 IMOBILIZADA EM ACCUREL MP-1000 CONTRA DIFERENTES ÁCIDOS GRAXOS

Condições: ácido graxo (70 mmol. L⁻¹), etanol (210 mmol. L⁻¹), lipase imobilizada (100 mg), *n*-heptano (5 mL), 40 °C, 200 rpm.

Os resultados obtidos comprovam a eficiência de LipC6G9 imobilizada em Accurel MP-1000 e fundamentam estudos futuros visando sua aplicação para síntese de ésteres em indústrias de perfumes, alimentos e cosméticos (GUPTA et al., 2004; HASAN et al., 2006).

5.3.4 Determinação da Regiosseletividade

Lipases podem ser classificadas em termos de regiosseletividade (especificidade posicional) em 1,3 específicas, que são aquelas que hidrolisam a ligação éster nas posições *sn* 1 e *sn* 3 dos triacilgliceróis; lipases 2-específicas, que hidrolisam a ligação éster nas posições *sn* 2 dos triacilgliceróis, e lipases não específicas, que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis de modo não específico ou aleatório (SUGIHARA et al., 1992).

Com o objetivo de determinar a regiosseletividade de LipC6G9, foram realizados ensaios de hidrólise em meio orgânico utilizando trioleína como substrato. A análise dos produtos oriundos da reação foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD) e os resultados de índice de retenção (*R_f*) foram comparados com os dos padrões. Foi observada apenas a presença de ácido oleico (produto majoritário) e 1,2 (2,3)-dioleína (Figura 23). Esse mesmo perfil foi observado para a reação realizada com a enzima livre. A não detecção de 1,3-dioleína como produto da reação confirma que LipC6G9 não hidrolisa ligações éster na posição *sn* 2 de triacilgliceróis, o que a classifica como uma lipase 1,3 específica (LOTRAKUL e DHARMSTHITI, 1997; SUGIHARA et al., 1992). Exemplos de lipases também classificadas como 1,3 específica descritas na literatura são as de *Candida antarctica* B, *Aspergillus niger*, *Thermomyces lanuginosa*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizomucor miehei*, além da lipase pancreática suína e humana (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; KRISHNA e KARANTH, 2002; SCHMID et al., 1998; GODFREY, 1995).

Em relação a lipases obtidas por metagenômica, LipC6G9 é a primeira descrita na literatura como 1,3 específica. Esse resultado é considerado promissor visto que lipases com esta propriedade tem grande potencial de aplicação na indústria de óleos e gorduras, catalisando reações de interesterificação ou

transesterificação para produção de lipídeos estruturados, que requerem inserção de ácidos graxos especificamente nas posições 1 e 3 do triacilglicerol.

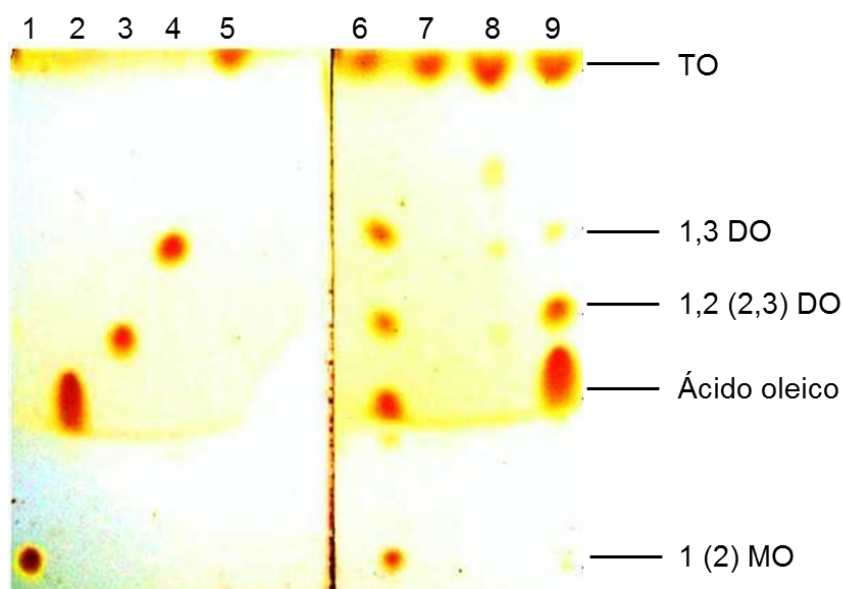


FIGURA 23 - DETERMINAÇÃO DA REGIOSSELETIVIDADE DE LIPC6G9 POR ANÁLISE DOS PRODUTOS DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DA TRIOLEÍNA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Linha1: 1(2)-monoleína (1(2)-MO); linha 2: ácido oleico; linha 3: 1,2(2,3)-dioleína (1,2(2,3)-DO); linha 4: 1,3-dioleína (1,3-DO); linha 5: trioleína (TO); linha 6: padrões; linha 7: controle trioleína; linha 8: tempo 0 h reação; linha 9: produtos da hidrólise.

5.3.5 Determinação da Enantiosseletividade de LipC6G9 Frente a Álcoois Secundários

A avaliação da enantiosseletividade de LipC6G9 foi realizada através de reações de transesterificação utilizando o álcool (*R,S*) 1-fenil-1-etanol e da hidrólise do éster análogo acetato de 1-feniletila (Figura 14, pag. 60). Como já mencionado, esses compostos são normalmente descritos na literatura com substrato modelo utilizado em resoluções cinéticas mediadas por lipases (DHAKE et al., 2012). As reações foram realizadas em vials de vidro de 4 mL com tampa, sob agitação magnética, a 35 °C. Para as duas reações utilizou-se hexano como solvente, e 100

mg de enzima imobilizada. Para a reação de transesterificação utilizou-se o acetato de vinila como doador acila, e na de hidrólise, água como nucleófilo.

Inicialmente, os padrões (1-fenil-1-etanol e acetato de 1-feniletila) sintetizados por métodos químicos (item 4.5.6) foram submetidos à cromatografia gasosa quiral para obtenção das melhores condições de separação dos enantiômeros (Figura 24a). Posteriormente, a análise dos produtos obtidos das reações enzimáticas foi realizada sob as mesmas condições (Figuras 24b,c). As amostras foram analisadas ao longo 60 h para determinação do tempo em que houvesse conversão de aproximadamente 50% do substrato, o que corresponde ao máximo de rendimento teórico para a resolução cinética, visto que o substrato é um racemato (GHANEM, 2007).

Na Tabela 8 estão apresentados os parâmetros de conversão (c), de excesso enantiomérico do substrato (ee_s) e do produto (ee_p) e o coeficiente enantiomérico (E) obtidos nas reações. Para determinação das configurações absolutas (enantiopreferência), foram realizados ensaios nas mesmas condições utilizando a lipase CALB como catalisador, visto que esta é descrita na literatura com uma enantiopreferência para o isômero *R* utilizando 1-fenil-1-etanol como substrato (OVERMEYER et al., 1999; ALMEIDA et al., 1998).

TABELA 8 - RESOLUÇÃO DE (R,S) 1-FENIL-1-ETANOL E (R,S) ACETATO DE 1-FENILETILA UTILIZANDO A LIPASE LIPC6G9 IMOBILIZADA EM ACCUREL MP-1000

Lipase	Substrato	Tempo (h)	C%	ee_s (%)	ee_p (%)	E	Enantiopreferência
LIPC6G9	1-fenil-1-etanol	30	49	> 95	> 95	> 200	<i>R</i>
	acetato de 1-feniletila	60	16	18	> 95	> 200	<i>R</i>
CALB	1-fenil-1-etanol	2	50	99	99	> 200	<i>R</i>
	acetato de 1-feniletila	2	50	99	99	> 200	<i>R</i>

(C) conversão do éster; (ee_s) excesso enantiomérico do substrato; (ee_p) excesso enantiomérico do produto; (E) coeficiente de enantiosseletividade

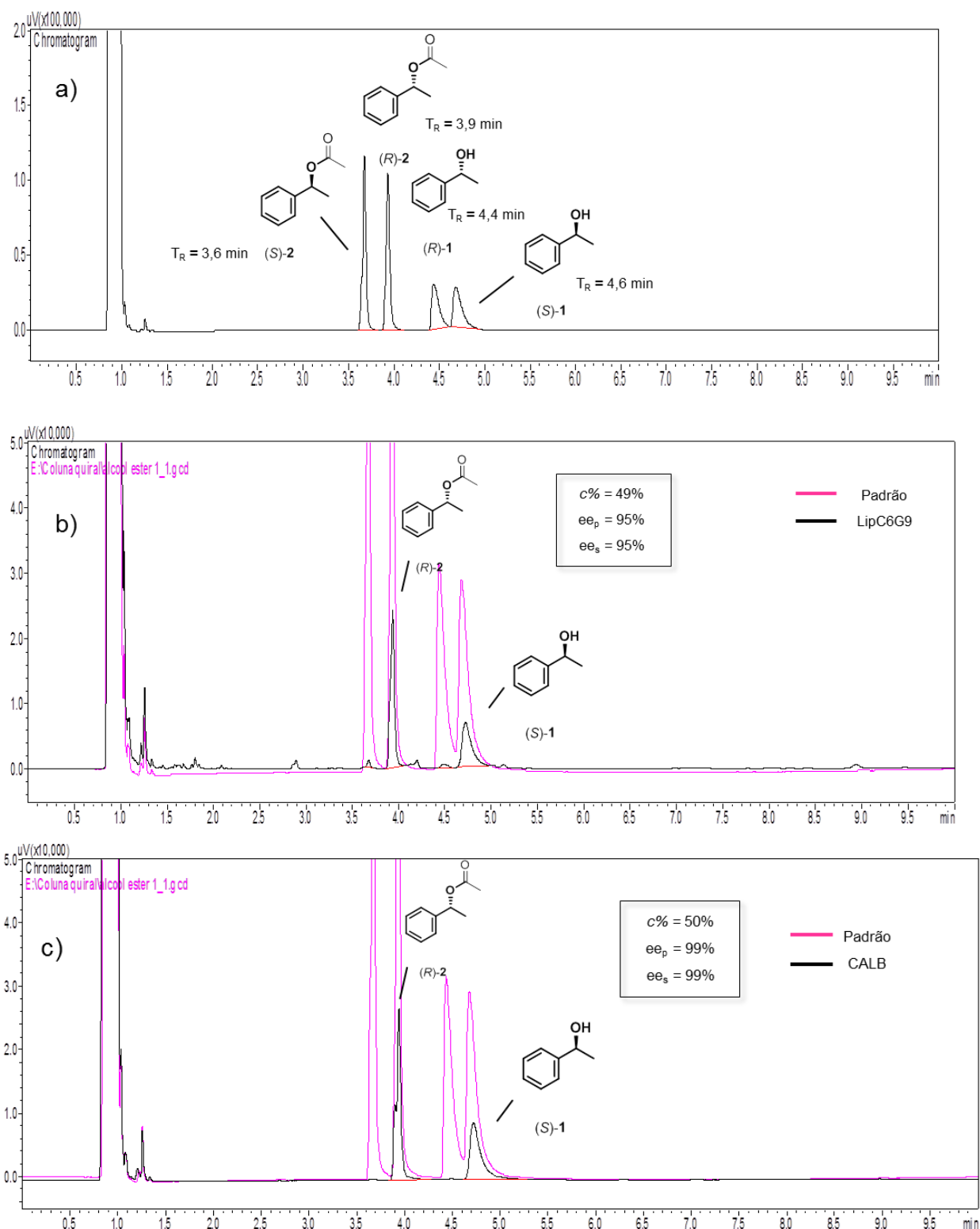


FIGURA 24 - A) SEPARAÇÃO E CONFIRMAÇÃO DOS PADRÕES (R,S) 1-FENIL-1-ETANOL E 1-FENIL-1-ETANOILA POR CROMATOGRAPHIA EM FASE GASOSA QUIRAL; B) RESOLUÇÃO CINÉTICA DO SUBSTRATO (R,S) 1-FENIL-1-ETANOL CATALISADA PELA LIPASE LipC6G9 E C) pela LIPASE *Candida antarctica* (CALB)

Coluna quiral (β -ciclodextrina), temperatura do detector 220 °C, gás de arraste (N_2), temperatura de 110 a 120 °C a 1 °C min^{-1} . Tempos de retenção (min): (S)-acetato de 1-feniletila 3,63; (R)-acetato de 1-feniletila 3,94; (R)-1-fenil-1-etanol 4,43; (S)-1-fenil-1-etanol 4,68. Condições reacionais: 1 mL de *n*-hexano, 1 mmol de 1-fenil-1-etanol, 4 mmol de acetato de vinila, 100 mg de enzima imobilizada, 35 °C.

Foram obtidos excelentes valores de excesso enantiomérico ($ee > 95\%$) para produto (*R*)-acetato de 1-feniletila e para o substrato (*S*)-1-fenil-1-etanol e um coeficiente enantiomérico (E) maior que 200, o que mostra elevada enantiosseletividade de LipC6G9 em relação ao enantiômero *R*. A Figura 23b apresenta o cromatograma da reação correspondente ao tempo de 30 h, onde pode ser observado 49% de conversão. O mesmo perfil cromatográfico foi observado na reação catalisada pela lipase CALB (Figura 24c), confirmando a enantiosseletividade de LipC6G9 para o isômero *R*. A partir de desses resultados, pode-se concluir que LipC6G9 segue a regra proposta por Kazlauskas et al. (1991).

Apesar da baixa conversão de 16% (Tabela 8), a hidrólise do éster (*R,S*) acetato de 1-feniletila também apresentou altos valores de excesso enantiomérico para o produto (*R*)-1-fenil-1-etanol ($ee_p > 95\%$) e um coeficiente enantiomérico E maior que 200. Em geral, enzimas utilizadas em resoluções exigem um valor de E de 50 ou maior, sendo valores de E maiores que 100 considerados excelentes (SUNNA et al., 2002).

Os resultados aqui obtidos para LipC6G9 imobilizada em Accurel são comparáveis aos das lipases comerciais de *Candida antarctica* B, *Pseudomonas cepacia* e *P. fluorescens*, que proporcionaram um excesso enantiomérico maior que 99% e E maior que 200 para o mesmo substrato utilizado neste trabalho (SOUZA et al., 2009). Entretanto, o tempo de reação necessário para obtenção 50% de conversão utilizando LipC6G9 é mais longo (30 h). Neste trabalho, utilizando CALB nas mesmas condições, foram obtidos 50% de conversão em apenas 2 h de reação (Tabela 8), provavelmente pela maior atividade por grama de suporte presente em CALB.

Apesar dessa diferença, os resultados reportados para LipC6G9 são promissores, uma vez que, além da alta atividade e especificidade apresentadas por formulações comerciais, os derivados imobilizados podem conter 100 vezes mais enzima por grama de suporte em relação à proporção utilizada neste trabalho para a imobilização de LipC6G9 (5 mg g^{-1} de suporte). Além disso, as condições reacionais ainda não estão otimizadas para LipC6G9, sendo necessários mais estudos envolvendo diferentes fatores, tais como a temperatura, solvente e a quantidade de enzima adicionada ao meio reacional.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que LipC6G9 foi imobilizada conjuntamente com a sua foldase no suporte Accurel, e que a enzima, nestas condições, apresentou atividade de hidrólise e de síntese de ésteres, estabilidade em solventes orgânicos polares e apolares e estabilidade térmica, além de ser regio e enantiosseletiva. Estes resultados sugerem que LipC6G9 pode ser utilizada em processos biocatalíticos de síntese de ésteres e fundamentam a continuidade dos estudos com esta enzima para o desenvolvimento de aplicações de interesse industrial.

Os principais resultados que nortearam esta conclusão foram os seguintes:

- O suporte Accurel MP-1000 foi o melhor para imobilização de LipC6G9 com eficiência de imobilização de 87% em 48 h e uma retenção de atividade de 152%.
- LipC6G9 imobilizada em Accurel MP-1000 apresentou atividade de esterificação na síntese de oleato de etila em *n*-heptano (16 U g^{-1}), com 90% de conversão em 8 h;
- LipC6G9 imobilizada manteve-se estável até a temperatura de 50 °C quando incubada por 8 h. A enzima também se mostrou estável em uma ampla faixa de solventes orgânicos polares e apolares mantendo mais de 80% de sua atividade residual após 8 h de incubação;
- Em relação à especificidade da enzima frente a diferentes ácidos graxos em reações de esterificação, melhores conversões (90% em 3 h) foram obtidas para ácidos graxos saturados de cadeia média e longa (C8, C14 e C16), com máxima atividade (29 U g^{-1}) obtida para ácido palmítico (C16);

- LipC6G9 foi classificada em relação à sua regiosseletividade como uma lipase 1,3 específica;
- Em relação à enantiosseletividade, LipC6G9 apresentou excelentes valores de excesso enantiomérico ($ee > 95\%$) e enantiosseletividade ($E > 200$) para isômero (*R*) de ambos os substratos avaliados (1-fenil-1-etanol e acetato de 1-feniletila).

7. PERSPECTIVAS

Os resultados relatados para LipC6G9 são promissores e abrem perspectivas para sua utilização em diferentes aplicações em biocatálise. Portanto, sugerem-se como estudos futuros:

- A aplicação de LipC6G9 imobilizada em Accurel MP-1000 em reações de esterificação e transesterificação buscando a otimização do processo de síntese de oleato de etila, a fim de obter maiores rendimentos;
- Aplicação em reações de interesterificação seletiva para obtenção de lipídios estruturados ou outros ésteres de interesse comercial como, por exemplo, ésteres de aromas, antioxidantes e flavonóides;
- A imobilização de LipC6G9 em outros suportes, com objetivo de aumentar a atividade e estabilidade da enzima, possibilitando sua reutilização em reações de síntese;
- A aplicação de LipC6G9 em resolução cinética de diferentes substratos para obtenção de fármacos opticamente puros ou intermediários de síntese, que são de grande demanda na indústria farmacêutica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, H; COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 589-595, 2003.
- ABDULLAH, A. Z.; SULAIMAN, N. S.; KAMARUDDIN, A. H. Biocatalytic esterification of citronellol with lauric acid by immobilized lipase on aminopropyl- grafted mesoporous SBA-15. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 2-3, p. 263-270, 2009.
- ADLERCREUTZ, P. **Biocatalysis in Non-Conventional Media In: Applied biocatalysis**. Eds: Straathof e Adlercreutz, Ed.Harwood academic publishers Netherlands, 2000.
- AHMED, E.H; RAGHAVENDRA, T.; MADAMWAR, D. An alkaline lipase from organic solvent tolerant *Acinetobacter* sp. EH28: Application for ethyl caprylate synthesis. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3628–3634, 2010.
- AIRES-BARROS, M. R. Biocatálise em Solventes Orgânicos. **Boletim de Biotecnologia**, v.72, p.2-13, 2002.
- AL-DURI, B.; YONG, Y. P. Lipase immobilization: an equilibrium study of lipases immobilized on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p.207 – 215, 2000.
- ALMEIDA, R. V.; BRANCO, R.V.; PEIXOTO, B., LIMA, C. S.; ALQUERES, S. M. C.; MARTINS, O .B.; ANTUNES, O. A.C.; FREIRE, D. M.G. Immobilization of a recombinant thermostable esterase (*Pf2001*) from *Pyrococcus furiosus* on microporous polypropylene: Isotherms, hyperactivation and purification. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 531-537, 2008.
- ALMEIDA, M. C.; R. RUIVO; C. MAIA; L. S. FREIRE; T. CORRÊA DE SAMPAIO; S. BARREIROS. Novozym 435 Activity in Compressed Gases. Water Activity and Temperature Effects. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 6, p. 494-499, 1998.
- ALBERTON, D.; D. A. MITCHELL; J. CORDOVA; P. PERALTA-ZAMORA; N. KRIEGER. Production of a Fermented Solid Containing Lipases of *Rhizopus microsporus* and Its Application in the Pre-Hydrolysis of a High-Fat Dairy Wastewater. **Food Technology and Biotechnology**. v. 48, n. 1, p. 28-35, 2010.
- ANDREWS, I.; P. DUNN; J. HAYLER; B. HINKLEY; D. HUGHES; B. KAPTEIN; K. LORENZ; S. MATHEW; T. RAMMELOO; L. WANG; A. WELLS; T. D. WHITE. Green Chemistry Articles of Interest to the Pharmaceutical Industry. **Organic Process Research & Development**, v. 15, n. 4, p. 748-756, 2011.
- ANSARI, S. A.; Q. HUSAIN. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. **Biotechnology Advances**. v. 30, n. 3, p. 512-523, 2012.

BABTIE, A.; TOKURIKI, N.; HOLLFELDER, F. What makes an enzyme promiscuous? **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 2, p. 200-207, 2010.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; XAVIER MALCATA, F. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 6, p. 392-416, 1996.

BARON, A. M.; ZAGO, E. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. SPIL: Simultaneous production and immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 29, p. 19-24, 2011.

BARON, A.M. **Preparação e caracterização de lipases imobilizadas para utilização em biocatálise**. Curitiba, 2008. 154 p. Tese (Doutorado em Química)–Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

BARROS, R. J.; MOURA-PINTO, P. G. V.; C.R. FRANSSEN, M.; AEDE, D. G.; E.M. JANSSEN, A. Regioselectivity and fatty acid specificity of *Chromobacterium viscosum* lipase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 7, p. 707-713, 1994.

BASTIDA, A.; SABUQUILLO, P.; ARMISEN, P.; FÉRNANDEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUIBAN, J. M. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v.58, p. 486-493, 1998.

BAYER, S.; C. BIRKEMEYER; M. BALLSCHMITER. A nitrilase from a metagenomic library acts regioselectively on aliphatic dinitriles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 1, p. 91-98, 2011.

BAYRAMOGLU, G.; HAZER, B.; ALTINTAS, B.; ARICA, M. Y. Covalent immobilization of lipase onto amine functionalized polypropylene membrane and its application in green apple flavor (ethyl valerate) synthesis. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 372-378, 2011.

BENAIGES, M.D.; ALARCÓN, M.; FUCIÑOS, P.; FERRER, P.; RUA, M.; VALERO, F. Recombinant *Candida rugosa* Lipase 2 from *Pichia pastoris*: Immobilization and use as biocatalyst in a stereoselective reaction. **Biotechnology Progress**, v. 26, n.5, 2010.

BRANCO, R.V. **Imobilização e caracterização de uma Esterase termoestável recombinante de *Pyrococcus furiosus***. Rio de Janeiro, 2008. 76 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de Óleos e Gorduras por Biotransformação. **Química Nova**, v. 27, p. 146-156, 2004.

CHAIYASO, T.; H-KITTIKUN, A.; ZIMMERMANN, W. Biocatalytic acylation of carbohydrates with fatty acids from palm fatty acid distillates. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 33, n. 5, p. 338-342, 2006.

CHANG, S. W.; YANG, C. J.; CHEN, F. Y.; AKOH, C. C.; SHIEH, C. J. Optimized synthesis of lipase-catalyzed L-ascorbyl laurate by Novozymo (R) 435. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 56, n. 1, p. 7-12, 2009.

CHEN, C.; FUJIMOTO, Y.; GIRDAUKAS, G.; SIH, J. Quantitative Analyses of Biochemical Kinetic Resolution of Enantiomers. **Journal of American Chemistry Society**, v. 104, p.7294-7299, 1982.

CHEN, J.; TSAI, S. Enantioselective Synthesis of (S)-Ibuprofen Ester Prodrug in Cyclohexane by *Candida rugosa* Lipase Immobilized on Accurel MP1000. **Biotechnology Progress**, v. 16, p. 986-992, 2000.

CHEN, C. K.-M.; LEE, G.-C.; KO T.-P.; TING, G. R.; HUANG, L.-M.; LIU, H.-J.; HO, Y.-F.; SHAW, J.-F.; WANG, A. H.-J. Structure of the *Alkalohyperthermophilic Archaeoglobus fulgidus* Lipase Contains a Unique C-Terminal Domain Essential for Long-Chain Substrate Binding. **Journal of Molecular Biology**, v.390, p.672– 685, 2009.

CHIRALVISION. **Suporte Técnico.** Disponível em: http://www.chiralvision.com/pdf/immozymes_product_list.pdf> Acesso em: Janeiro de 2013.

CHOW, J., KOVACIC, F., DALL ANTONIA, Y., KRAUSS, U., FERSINI, F., SCHMEISSER, C., LAUINGER, B., BONGEN, P., PIETRUSZKA, J., SCHMIDT, M., MENYES, I., BORNSCHEUER, U. T., ECKSTEIN, M., THUM, O., LIESE, A., MUELLER-DIECKMANN, J., JAEGER, K.-E., AND STREIT, W. R. The Metagenome-Derived Enzymes LipS and LipT Increase the Diversity of Known Lipases. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e47665, 2012.

CHRISTENSEN, M. W.; ANDERSEN, L.; HUSUM, T. L.; KIRK, O. Industrial lipase immobilization. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.105, p. 318-321, 2003.

CHUN, G. T., AGATHOE, S. N. Immobilization of *Tolypocladiuminflatum* spores into porous Celite beads for cyclosporin production. **Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 237–254, 1989.

CONTESINI, F. J.; D. B. LOPES; G. A. MACEDO; M. D. G. NASCIMENTO; P. D. O. CARVALHO. *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 67, n. 3–4, p. 163-171, 2010.

CORREIA, V. A. B. **Seleção e Caracterização Molecular de uma Lipase de Metagenômica de Solo de Cerrado**. Brasília, 2010, p. 49 (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia. Universidade Católica de Brasília.

COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. N. D. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, v. 22, n. p. 863-873, 1999.

COSTA, A. C. S. **Resolução cinética enzimática de alcoóis estericamente impedidos utilizando lipases**. Relatório anual – Programa de Pós-Graduação em Química. Curitiba; 2012. Universidade Federal do Paraná.

CÔTÉ, A.; SHARECK, F. Expression and characterization of a novel heterologous moderately thermostable lipase derived from metagenomics in *Streptomyces lividans*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p.21-30, 2010.

COUTO, G. H.; GLOGAUER, A.; FAORO, H.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Isolation of a novel lipase from a metagenomic library derived from mangrove sediment from the south Brazilian coast. **Genetics and Molecular Research**, v.9, p. 514-523, 2010.

CYGLER, M.; SCHRAG, J.D. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. **Methods in Enzymology**, part. A, v. 284, p. 3-27, 1997.

DANDAVATE, V.; JINJALA, J.; KEHARIA, H.; MADAMWAR, D. Production, partial purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from *Burkholderia multivorans* V2 and its application for ester synthesis. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 13, p. 3374–3381, 2009.

DHAKE, K. P.; DESHMUKH, K. M.; WAGH, Y. S.; SINGHAL, R. S.; AND BHANAGE, B. M. Investigation of steapsin lipase for kinetic resolution of secondary alcohols and synthesis of valuable acetates in non-aqueous reaction medium. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 77, p. 15-23, 2012.

DHAKE, K.; BHATTE, K.; WAGH, Y.; SINGHAL, R.; AND BHANAGE, B. Immobilization of steapsin lipase on macroporous immovead-350 for biodiesel production in solvent free system. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, n. 5, p. 959-965, 2012.

DHEEMAN, D. S.; HENEHAN, G. T. M.; FRIAS, J. M. Purification and properties of *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 lipase and its potential in flavour ester synthesis. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3373-3379, 2011.

DOUKYU, N.; OGINO, H. Organic solvent-tolerant enzymes. **Biochemical Engineering Journal**, v.48, p.270–282, 2010.

ELEND, C. SCHMEISSER, C.; LEGGEWIE, C.; BABIAK, P.; CARBALLEIRA, J. D. ; STEELE, H. L.; REYMOND, J.-L.; JAEGER, K.-E.; STREIT, W. R. Isolation and Biochemical Characterization of Two Novel Metagenome-Derived Esterases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 3637–3645, 2006.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**, 4 ed. Springer: Berlin, 2000.

FAORO, H.; GLOGAUER, A.; SOUZA, E. M.; RIGO, L. U.; CRUZ, L. M.; MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. O. Identification of a new lipase family in the Brazilian Atlantic Forest soil metagenome. **Environmental Microbiology Reports**, v. 3, p. 750–755, 2011.

FAN, X. J., LIU, X. L., WANG, K., WANG, S. D., HUANG, R., LIU, Y. Highly soluble expression and molecular characterization of an organic solvent-stable and thermotolerant lipase originating from the metagenome. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 72, n. 3-4, p. 319-326, 2011.

FERNANDEZ-ALVARO, E.; R. KOURIST; J. WINTER; D. BOTTCHER; K. LIEBETON; C. NAUMER; J. ECK; C. LEGGEWIE; K. E. JAEGER; W. STREIT; U. T. BORNSCHEUER. Enantioselective kinetic resolution of phenylalkyl carboxylic acids using metagenome-derived esterases. **Microbial Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 59-64, 2010.

FERNANDES, M. L. M.; SAAD, E. B.; MEIRA, J. A.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 263, p. 8-13, 2007.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*. Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p.197–212, 2010.

FERRATO, F; CARRIERE, F.; SARDA, L.; VERGER, R. A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. **Methods in Enzymology**, part B, v. 284, p. 327-347, 1997.

FORDE, J.; E. TULLY; A. VAKUROV; T. D. GIBSON; P. MILLNER; C. Ó'FÁGÁIN. Chemical modification and immobilisation of laccase from *Trametes hirsuta* and from *Myceliophthora thermophila*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 46, n. 6, p. 430-437, 2010.

FORESTI, M. L.; ERRAZU, A.; FERREIRA, M. L. Effect of several reaction parameters in the solvent-free ethyl oleate synthesis using *Candida rugosa* lipase immobilised on polypropylene. **Biochemical Engineering Journal**, v. 7 25, n. 1, p. 69-77, 2005.

GABOR, E. M.; DE VRIES, E. J.; JANSSEN, D. B. Construction, characterization, and use of small-insert gene banks of DNA isolated from soil and enrichment cultures for the recovery of novel amidases. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 9, p. 948-958, 2004.

GANDHI, N. N.; PATIL, N. S.; SAWANT, S. B.; JOSHI, J. B.; WANGIKAR, P. P.; MUKESH, D. Lipase-catalyzed esterification. **Catalysis Reviews-Science and Engineering**. v. 42, n. 4, p. 439-480, 2000.

GAUR, R.; A. GUPTA; S. K. KHARE. Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. **Process Biochemistry**. v. 43, n. 10, p. 1040-1046, 2008.

GAYOT, S.; SANTARELLI, X.; COULON, D. Modification of flavonoid using lipase in non-conventional media: effect of the water content. **Journal of Biotechnology**, v. 101, n. 1, p. 29-36, 2003.

GHAMGUI, H.; MILED, N.; KARRA-CHAÂBOUNI, M.; GARGOURI, Y. Immobilization studies and biochemical properties of free and immobilized *Rhizopus oryzae* lipase onto CaCO_3 : A comparative study. **Biochemical Engineering Journal**, v.37, p. 34-41, 2007.

GHANEM, A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. **Tetrahedron**, v. 63, n. 8, p. 1721-1754, 2007.

GLOGAUER, A.; MARTINI, V. P.; FAORO, H.; COUTO, G. H.; MÜLLERSANTOS, M.; MONTEIRO, R. A.; MITCHELL, D. A.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; KRIEGER, N. Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. **Microbial Cell Factories**, v. 10, p. 54, 2011.

GODFREY, T. Lipases for industrial use. **Lipid Technology**, v. 7 ; p. 58–61, 1995.

GOLYSHIN, P.N. Microbial Enzymes Mined from the Urania Deep-Sea Hypersaline Anoxic Basin. **Chemistry & Biology**, v. 12, n. 8, p. 895-904, 2005.

GONÇALVES, A. P. V. **Imobilização de uma cutinase recombinada no zeólito NaY: estudos cinéticos e de estabilidade**. Lisboa, 1999, p.246f. Tese de Doutorado. Programa de pós-graduação em biotecnologia. Universidade Técnica de Lisboa.

GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, p. 111–120, 2006.

GROCHULSKI, P.; LI, Y.; SCHRAG, J. D.; CYGLER, M. Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. **Protein Science**, v. 3, p. 82-91, 1994.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 15-32, 2002.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.64: p. 763-781, 2004.

GUISAN, J. M., SABUQUILLO, P., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., FERNANDEZ-LORENTE, G., MATEO, C., HALLING, P. J., KENNEDY, D., MIYATA, E. Preparation of new lipases derivatives with high activity-stability in anhydrous media: adsorption on hydrophobic supports plus hydrophilization with polyethylenimine. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 11, n. 4-6, p. 817-824, 2001.

HABULIN, M.; Z. KNEZ. Optimization of (R,S)-1-phenylethanol kinetic resolution over *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 58, n. 1-4, p. 24-28, 2009.

HANDELSMAN, J., RONDON, M. R., BRADY, S. F., CLARDY, J. GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v. 5, n. 10, p. 245-249, 1998.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, B. Understanding enzyme immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 453–468, 2008.

HANDELSMAN, J. Metagenomics application of genomics to uncultured microorganisms, **Microbiology and Molecular Biology**. v. 68 p. 669–685, 2004.

HÅRDEMAN, F.; SJÖLING, S. Metagenomic approach for the isolation of a novel lowtemperature- active lipase from uncultured bacteria of marine sediment. **Fems Microbiology Ecology**, v. 59, n. 2, p. 524-534, 2007.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HASAN, F., SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advance**, v. 27, p. 782-798, 2009.

HEALY, F. G.; RAY, R. M.; ALDRICH, H. C.; WILKIE, A. C.; INGRAM, L. O.; SHANMUGAM, K. T. Direct isolation of functional genes encoding cellulases from the microbial consortia in a thermophilic, anaerobic digester maintained on lignocellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 4, p. 667-674, 1995.

HERNANDEZ-RODRIGUEZ, B., CORDOVA, J., BARZANA, E., AND TORRES, E. F. Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by thermotolerant fungi in solid-state fermentation. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 61, n. 3-4, p. 136-142, 2009.

HERNÁNDEZ-MARTÍN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym[®] 435 Lipozyme[®] TL IM. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 277-286, 2008.

HOLM, H. C.; COWAN, D. The evolution of enzymatic interesterification in the oils and fats industry. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.110, p.679-691, 2008.

HORCHANI, H.; BOUAZIZ, A.; GARGOURI, Y.; AND SAYARI, A. Immobilized *Staphylococcus xylosus* lipase-catalysed synthesis of ricinoleic acid esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 75, n. 0, p. 35-42, 2012.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, n. 1-3, p. 155-170, 2004.

HOBSON, A. H.; BUCKLEY, C. M.; AAMAND, J. L.; JORGENSEN, S. T.;DIDERICHSEN, B.; McCONNELL, D. J. Activation of a bacterial lipase by its chaperone. **PNAS**, v. 90, p.5682–5686, 1993.

HU, Y. F.; FU, C. Z.; HUANG, Y. P.; YIN, Y. S.; CHENG, G.; LEI, F.; LU, N.; LI, J.; ASHFORTH, E. J.; ZHANG, L. X.; ZHU, B. L. Novel lipolytic genes from the microbial metagenomic library of the South China Sea marine sediment. **Fems Microbiology Ecology**, v. 72, n. 2, p. 228-237, 2010.

ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, n. 1, p. 53-58, 2001.

IHARA, F.; I. OKAMOTO; K. AKAO; T. NIHIRA; Y. YAMADA. Lipase modulator protein (liml) of *Pseudomonas sp* strain-109. **Journal of Bacteriology**. v. 177, n. 5, p. 1254-1258, 1995.

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B.; COLSON, C.; HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v.15, p. 29-63, 1994.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

JAEGER, K .E., DIJKSTRA, B. W., REETZ, M. T. Bacterial Biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. **Annual Reviews Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K. E., EGGERT, T., EIPPER, A., REETZ, M. T. Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, n. 5, p. 519-530, 2001.

JEON, J. H.; KIM, J-T.; KANG, S. G.; LEE, J-H.; KIM, S.J. Characterization and its Potential Application of Two Esterases Derived from the Arctic Sediment Metagenome. **Marine Biotechnology**, v.11 p.307-316, 2009.

JIANG, C. J.; S. X. LI; F. F. LUO; K. JIN; Q. WANG; Z. Y. HAO; L. L. WU; G. C. ZHAO; G. F. MA; P. H. SHEN; X. L. TANG; B. WU. Biochemical characterization of two novel beta-glucosidase genes by metagenome expression cloning. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3272-3278, 2011.

JIANG, C. J.; P. H. SHEN; B. YAN; B. WU. Biochemical characterization of a metagenome-derived decarboxylase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 1, p. 58-63, 2009.

JIN, P., PEI, X. L., DU, P. F., YIN, X. P., XIONG, X. L., WU, H. L., ZHOU, X. L. Overexpression and characterization of a new organic solvent-tolerant esterase derived from soil metagenomic DNA. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 234-240, 2012.

KAEWTHONG, W.; SIRISANSANEEYAKUL, S.; PRASERTSAN, P.; H-KITTIKUN, A. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1525-1530, 2005.

KAGA, H.; B. SIEGMUND; E. NEUFELLNER; K. FABER; F. PALTAUF. Stabilization of *Candida* lipase against acetaldehyde by adsorption onto celite. **Biotechnology Techniques**, v. 8, n. 6, p. 369-374, 1994.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555-569, 2012.

KAZLAUSKAS, R.; WEISSFLOCH, A.N.E.; RAPPAPORT, A.T.; CUCCIA, L.A. A Rule To Predict Which Enantiomer of a Secondary Alcohol Reacts Faster in Reactions Catalyzed by Cholesterol Esterase, Lipase from *Pseudomonas cepacia*, and Lipase from *Candida rugosa*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 56, p. 2656-2665, 1991.

KHARRAT, N.; BEN ALI, Y.; MARZOUK, S.; GARGOURI, Y. T.; KARRA-CHAABOUNI, M. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1083-1089, 2011.

KHEADR, E. E.; VUILLEMARD, J. C.; EL-DEEB, S. A. Impact of liposome-encapsulated enzyme cocktails on cheddar cheese ripening. **Food Research International**, v. 36, n. 3, p. 241-252, 2003.

KIM, Y. J.; CHOI, G. S.; KIM, S. B.; YOON, G. S.; KIM, Y. S.; RYU, Y. W. Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. **Protein Expression and Purification**, v.45, p. 315-323, 2006.

KIM, H.; H. S. KWON; J. AHN; C. H. LEE; I. S. AHN. Evaluation of a silica-coated magnetic nanoparticle for the immobilization of a His-tagged lipase. **Biocatalysis and Biotransformation**. v. 27, n. 4, p. 246-253, 2009.

KIM, H. Y., KWON, E. J., KIM, S. K., JEONG, Y. S., KIM, J., YUN, H. D., KIM, H. Molecular cloning and characterization of a novel family VIII alkaline esterase from a compost metagenomic library. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, p. 45-49, 2010.

KLIBANOV, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. **Nature**, v.409, p.241-246, 2001.

KLIBANOV, A.M. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? **Trends in Biotechnology**, v.15, n.3, p. 97-101, 1997.

KNIETSCH, A.; WASCHKOWITZ, T.; BOWIEN, S.; HENNE, A.; DANIEL, R. Construction and Screening of Metagenomic Libraries Derived from Enrichment Cultures: Generation of a Gene Bank for Genes Conferring Alcohol Oxidoreductase Activity on *Escherichia coli*. **Applied Environmental Microbiology** v.69, p.1408-1416, 2003.

KNEZEVIC, Z.; MILOSAVIC, N.; BEZBRADICA, D.; JAKOVLJEVIC, Z.; PRODANOVIC, R. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit C® supports by covalent attachment. *Biochemical Engineering Journal*, v.30, p. 269–278, 2006.

KOTIK, M.; V. STEPANEK; M. GRULICH; P. KYSLIK; A. ARCHELAS. Access to enantiopure aromatic epoxides and diols using epoxide hydrolases derived from total biofilter DNA. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 65, n. 1-4, p. 41-48, 2010.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 126-139, 2004.

KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J.C.; BARON, A.; LIMA, V.; MITCHELL, D. Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, p. 279-286, 2004.

KRISHNA, S. H. Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 3-4, p. 239-267, 2002.

KRISHNA, S. H.; N. G. KARANTH. Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. **Catalysis Reviews-Science and Engineering**. v. 44, n. 4, p. 499-591, 2002.

KUMAR, A.; KANWAR, S. S. Synthesis of ethyl ferulate in organic medium using Celite-immobilized lipase. **Bioresource Technology**, v.102, p. 2162-2167, 2011.

KVITTINGEN, L.; SJURSNE, B.; ANTHONSEN, T.; HALLING, P. Use of salt hydrates to buffer optimal water level during lipase catalyzed synthesis in organic media - a practical procedure for organic chemists. **Tetrahedron**, v. 48, 11 n. 13, p. 2793-2802, 1992.

LAANE, S.; BOEREN, K. VOS; C. VEEGER. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.30, p. 81-87, 1987.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LÄMMLE, K. ZIPPER, H. BREUER, M. HAUER B., BUTA, C. BRUNNER, G. RUPP, S. Identification of novel enzymes with different hydrolytic activities by metagenome expression cloning. **Journal of Biotechnology**, v.127, p. 575-592, 2007.

LEE, C. C.; KIBBLEWHITE-ACCINELLI, R. E.; WAGSCHAL, K.; ROBERTSON, G. H.;WONG, D. W. S. Cloning and characterization of a cold-active xylanase enzyme from an environmental DNA library. **Extremophiles**, v. 10, n. 4, p. 295-300, 2006.

LEE, M. H.; K. H. OH; C. H. KANG; J. H. KIM; T. K. OH; C. M. RYU; J. H. YOON. Novel Metagenome-Derived, Cold-Adapted Alkaline Phospholipase with Superior Lipase Activity as an Intermediate between Phospholipase and Lipase. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 78, n. 14, p. 4959-4966, 2012.

LIU, C.H.; HUANG, C.C.; WANG, Y.W.; LEE, D.J.; CHANG, J.S. Biodiesel production by enzymatic transesterification catalyzed by *Burkholderia* lipase immobilized on hydrophobic magnetic particles. **Applied Energy**, v. 100, n. 0, p. 41-46, 2012.

LIU, Y.; ZHANG ,X.; TANC, H.; YAN, Y.; HAMEED, B.H. Effect of pretreatment by different organic solvents on esterification activity and conformation of immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase. **Process Biochemistry**, v.45, p. 1176-1180, 2010.

LIU, K.; WANG, J.; BU, D.; ZHAO, S.; MCSWEENEY, C.; YU, P.; LI, D. Isolation and biochemical characterization of two lipases from a metagenomic library of China Holstein cow rumen. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v.385, p. 605-611, 2009.

LORENZONI, A. S. G.; GRAEBIN, N. G.; MARTINS, A. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ZÁCHIA AYUB, M. A.; RODRIGUES, R. C. Optimization of pineapple flavour synthesis by esterification catalysed by immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 27, n. 2, p. 196-200, 2012.

LORENZ, P; ECK, J. Metagenomics and industrial applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 6, p. 510-516, 2005.

LOTTRAKUL, P.; DHARMSTHITI, S. Purification and characterization of lipase from *Aeromonas sobria* LP004. **Journal of Biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 113-120, 1997

LOWRY, R. R.; TINSLEY, J. I. Rapid colorimetric determination of free acids. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v. 53, p. 470-472, 1976.

MA, L.; PERSSON, M.; ADLERCREUTZ, P. Water activity dependence of lipase catalysis in organic media explains successful transesterification reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 7, p. 1024-1029, 2002.

MADAN, B., AND MISHRA, P. Co-expression of the lipase and foldase of *Pseudomonas aeruginosa* to a functional lipase in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 597–604, 2010.

MADALOZZO, A. D. **Síntese de Ésteres Etílicos Utilizando uma Lipase Recombinante de *Rhizopus oryzae***. Curitiba, 2011, p.168, (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências-Bioquímica. Universidade Federal do Paraná.

MARTINI, V. P. **Caracterização Molecular e Bioquímica de Novas Lipases Obtidas por Prospecção Metagenômica com Aplicação em Biocatálise**. Curitiba, 2012, p.128, Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Paraná.

MARCHETTI, J.M.; MIGUEL, V.U.; ERRAZU, A.F. Possible methods for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.11, p. 1300–1311, 2007.

MASOMIAN, M.; ABD RAHMAN, R.; SALLEH, A.; BASRI, M. A unique thermostable and organic solvent tolerant lipase from newly isolated *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strain HZ: physical factor studies. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 26, n. 9, p. 1693-1701, 2010.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40 p. 1451–1463, 2007.

MATEO, C.; TORRES, R.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; ORTIZ, C.; FUENTES, M.; HIDALGO, A.; LOPEZ-GALLEGO, F.; ABIAN, O.; PALOMO, J. M.; BETANCOR, L.; PESSELA, B. C. C.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Epoxy-amino groups: A new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 3, p. 772-777, 2003.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 7, p. 509-515, 2000.

MATSUMOTO, M.; OHASHI, K. Effect of immobilization on thermostability of lipase from *Candida rugosa*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14, n. 1, p. 75-77, 2003.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; VÉLEZ, A. M.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. D. L. C.; DE CASTRO, H. F. Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 503-511, 2012.

MENDES, A. A. **Seleção de Suportes e Protocolos de Imobilização de Lipases Para a Síntese Enzimática de Biodiesel**, São Carlos, p. 225, Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

MU, H.; PORSGAARD, T. The metabolism of structured triacylglycerols. **Progress in Lipid Research**, v. 44, p. 430-448, 2005.

NETTO, C. G. C. M.; H. E. TOMA; L. H. ANDRADE. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85-86, n. 0, p. 71-92, 2013.

NUNES, P.A., PIRES-CABRAL, P., FERREIRA-DIAS, S. Production of olive oil enriched with medium chain fatty acids catalysed by commercial immobilized lipases. **Food Chemistry**, v. 127, p. 993-998, 2011.

OKABE, S.; SUGANUMA, M.; TAADA, Y.; MIZUTANI, M. Disaccharide esters screened for inhibition of tumor necrosis factor- α release are new anti-cancer agents. **Japanese journal of cancer research**, n. 90, p. 669-675, 1999.

OTTOSSON, J.; FRANSSON, L.; KING, J.; HULT, K. Size as a parameter for solvent effects on *Candida antarctica* lipase B Enantioselectivity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1594, p. 325-334, 2002.

OSHIMA-HIRAYAMA, N.; K. YOSHIKAWA; T. NISHIOKA; J. I. ODA. Lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 239-246, 1993.

OVERMEYER, A.; S. SCHRADER-LIPPELT; V. KASCHE; G. BRUNNER. Lipase-catalysed kinetic resolution of racemates at temperatures from 40 °C to 160 °C in supercritical CO₂. **Biotechnology Letters**, v. 21, n. 1, p. 65-69, 1999.

PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.27, n. 3-5, p.187-204, 2000.

PALOMO, J.M., MUÑOZ, G., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., MATEO, C., FUENTES, M., GUIBAN, J.M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Modulation of *Mucor miehei* lipase properties via directed immobilization on different hetero-functional epoxy resins Hydrolytic resolution of (R,S)-2-butyryl-2-phenylacetic acid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.836, p.1–10, 2002 a.

PALOMO, J.M., MUÑOZ, G., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., MATEO, C., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GUIBAN, J.M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19–20, p. 279–286, 2002 b.

PAQUES, F.W; MACEDO, G.A. Lipases de látex vegetais: Propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v.29, n.1, p. 93-99, 2006.

PARK, H.-J.; JEON, J. H.; KANG, S. G.; LEE, J.-H.; LEE, S.-A.; KIM, H.-K. Functional expression and refolding of new alkaline esterase, EM2L8 from deep-sea sediment metagenome. **Protein Expression and Purification**, v. 52, n. 2, p. 340-347, 2007.

PAUWELS, K., WYNS, L., TOMMASSEN, J., SAVVIDES, S.N., VAN GELDER, P. Structure of a membrane-based steric chaperone in complex with its lipase substrate. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 13, p. 374-375, 2006.

PENCREAC'H, G.; BARATTI, J. C. Properties of free and immobilised lipase from *Burkholderia cepacia* in organic media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 2, p. 276-280, 1999.

PETKAR, M.; LALI, A.; CAIMI, P.; DAMINATI, M. Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic**, v. 39, n. 1-4, p. 83-90, 2006.

PENG, P.; LIN, J.; WEI, D. Co-expression of an organic solvent-tolerant lipase and its cognate foldase of *Pseudomonas aeruginosa* CS-2 and the application of the immobilized recombinant lipase. **Appl Biochem Biotechnol**, v.165, p.926- 937, 2011.

PERSSON, M.; MLADENOSKA, I.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Preparation of lipases for use in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p. 833-841, 2002.

PIRES-CABRAL, P.; DA FONSECA, M. M. R.; FERREIRA-DIAS, S. Esterification activity and operational stability of *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams in the production of ethyl butyrate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 246–252, 2010.

POUDEROYEN, G.; EGGERT, T.; JAEGER, K.E.; DIJKSTRA, B. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal α/β hydrolase fold enzyme. **Journal of Molecular Biology**, v. 309, p. 215-226, 2001.

RAHMAN, R.; BAHARUM, S. N.; BASRI, M.; AND SALLEH, A. B. High-yield purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas sp* strain S5. **Analytical Biochemistry**, v. 341, n. 2, p. 267-274, 2005.

REES, D. G.; P. J. HALLING. Chemical modification probes accessibility to organic phase: proteins on surfaces are more exposed than in lyophilized powders. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 27, n. 8, p. 549-559, 2000.

RHEE J. K, AHN D. G, KIM Y. G, OH J. W. New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormonesensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.2, p. 817-825, 2005.

ROH, C.; VILLATTE, F. Isolation of a low-temperature adapted lipolytic enzyme from uncultivated micro-organism. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, p. 116-123, 2008.

RONDON, M. R.; AUGUST, P. R.; BETTERMANN, A. D.; BRADY, S. F.; GROSSMAN, T. H.; LILES, M. R.; LOIACONO, K. A.; LYNCH, B. A.; MACNEIL, I. A.; MINOR, C.; TIONG, C. L.; GILMAN, M.; OSBURNE, M. S.; CLARDY, J.; HANDELSMAN, J.; GOODMAN, R. M. Cloning the Soil Metagenome: a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2541-2547, 2000.

ROUF, A.; P. GUPTA; M. A. AGA; B. KUMAR; A. CHAUBEY; R. PARSHAD; S. C. TANEJA. Chemoenzymatic synthesis of piperoxan, prosympal, dibozane, and doxazosin. **Tetrahedron-Asymmetry**, v. 23, n. 22-23, p. 1615-1623, 2012.

SALIS, A.; PINNA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, v. 119, n. 3, p. 291-299, 2005.

SALIS, A.; SOLINAS, V.; MONDUZZI, M. Wax esters synthesis from heavy fraction of sheep milk fat and cetyl alcohol by immobilized lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.21, n.4-6, p.167-174, 2003.

SALUM, T. F. C.; BARON, A. M.; ZAGO, E.C.; TURRA, V.; BARATTI, J. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. An Efficient System for Catalyzing Ester Synthesis Using a Lipase from a Newly Isolated *Burkholderia cepacia* Strain. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 26, p. 197-203, 2008.

SALUM, T. F. C.; VILLENEUVE P.; BAREA B.; YAMAMOTO C. I.; CÔCCO L. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1348-54, 2010.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SARDA, L. E DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esteres en emulsion. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 30, p. 513- 521, 1958.

SCHMID, R. D.; R. VERGER. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. **Angewandte Chemie-International Edition**. v. 37, n. 12, p. 1609-1633, 1998.

SCHRAG, J. D.; LI, Y. G.; CYGLER, M.; LANG, D. M.; BURGDORF, T.; HECHT, H. J.; SCHMID, R.; SCHOMBURG, D.; RYDEL, T. J.; OLIVER, J. D.; STRICKLAND, L. C.; DUNAWAY, C. M.; LARSON, S. B.; DAY, J.; MCPHERSON, A. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase, **Structure**, v. 5, n. 2, p. 187-202, 1997.

SHAH, S.; GUPTA, M. N. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 409-414, 2007.

SHAH, S.; SHARMA, S.; GUPTA, M. N. Biodiesel Preparation by Lipase-Catalyzed Transesterification of Jatropha Oil. **Energy & Fuels**, v. 18, n. 1, p. 154-159, 2004.

SHARMA, D., B. SHARMA A.K. SHUKLA. Biotechnological approach of microbial lipase: A review. **Biotechnology**, v.10, p. 23-40, 2011.

SHIEH, C. J.; LIAO, H. F.; LEE, C. C. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 88, n. 2, p. 103-106, 2003.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SAMUKAWA, T.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.;AND TOMINAGA, Y. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 7, p. 789-793, 1999.

SIMON, L. M.; LÁSZLÓ, K.; VÉRTESI, A.; BAGI, K.; SZAJÁNI, B. Stability of hydrolytic enzymes in water-organic solvent systems. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.4, n 1-2, p. 41-45, 1998.

SMITH, P. K.; R. I. KROHN; G. T. HERMANSON; A. K. MALLIA; F. H. GARTNER; M. D. PROVENZANO; E. K. FUJIMOTO; N. M. GOEKE; B. J. OLSON; D. C. KLENK. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 1, p. 97-103, 2003.

SOARES, C. M. F. **Otimização por planejamento experimental da imobilização de lipase em sílica de porosidade controlada na presença de estabilizantes**. São Paulo, 2000, p. 170, Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas.

SOARES, C. F.; H. DE CASTRO; F. MORAES; G. ZANIN. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 79, n. 1-3, p. 745-757, 1999.

SOUZA, R.; O. A. C. ANTUNES; W. KROUTIL; C. O. KAPPE. Kinetic Resolution of rac-1-Phenylethanol with Immobilized Lipases: A Critical Comparison of Microwave and Conventional Heating Protocols. **Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 16, p. 6157-6162, 2009.

STAMATIS, H.; XENAKIS, A.; BORNSCHEUER, U.; SCHEPER, T.; MENGE, U.; KOLISIS, F. N. *Pseudomonas-cepacia* lipase - esterification reactions in aot microemulsion systems. **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 7, p. 703-708, 1993.

STREIT, W. R.; SCHMITZ, R. A. Metagenomics - the key to the uncultured microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 492-498, 2004.

STUER, W.; JAEGER, K. E.; WINKLER, U. K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aureginosa*. **The Journal of Bacteriology**, v. 168, p. 1070-1074, 1986.

SUI, Y.; Y. CUI; Y. NIE; G.-M. XIA; G.-X. SUN; J.-T. HAN. Surface modification of magnetite nanoparticles using gluconic acid and their application in immobilized lipase. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, n. 0, p. 24-28, 2012.

SUTILI, F. K.; RUELA, H. S.; LEITE, S. G. F.; MIRANDA, L. S. D. M.; LEAL, I. C. R.; DE SOUZA, R. O. M. A. Lipase-catalyzed esterification of steric hindered fructose derivative by continuous flow and batch conditions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85-86, n. 0, p. 37-42, 2013.

SUGIHARA, A.; UESHIMA, M.; SHIMADA, Y.; TSUNASAWA, S.; TOMINAGA, Y. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *pseudomonas-cepacia*. **Journal of Biochemistry**, v. 112, n. 5, p. 598-603, 1992.

SUNNA, A.; HUNTER, L.; HUTTON, C. A.; AND BERGQUIST, P. L. Biochemical characterization of a recombinant thermoalkalophilic lipase and assessment of its substrate enantioselectivity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 4, p. 472-476, 2002.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K. et al. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 628-34, 2010.

TIRAWONGSAROJ, P.; SRIPRANG, R.; HARNPICHARNCHAI, P.; THONGARAM, T.; CHAMPREDA, V.; TANAPONGPIPAT, S.; POOTANAKIT, K.; EURWILAICHITR, L. Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library. **Journal of Biotechnology**, v. 133, n. 1, p. 42-49, 2008.

TISS, A.; CARRIERE, F.; VERGER, R. Effects of Arabic gum on interfacial lipases binding and activity. **Analytical Biochemistry**, v. 294, n. 1, p. 36-43, 2001.

TOLEDO, M. V.; C. JOSE; S. E. COLLINS; R. D. BONETTO; M. L. FERREIRA; L. E. BRIAND. Esterification of R/S-ketoprofen with 2-propanol as reactant and solvent

catalyzed by Novozym (R) 435 at selected conditions. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 83, n. p. 108-119, 2012.

TRAUB, P. C., SCHMIDT-DANNERT, C., SCHMITT, J., SCHMID, R. D. Genesynthesis, expression in *E. coli*, and in vitro refolding of *Pseudomonassp.* KW56 and *Chromobacterium viscosum* lipases and their chaperones. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.55, p.198–204, 2001.

TUTAR, H.; YILMAZ, E.; PEHLIVAN, E.; AND YILMAZ, M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on sporopollenin from *Lycopodium clavatum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, n. 3, p. 315-320, 2009.

VAN PELT, S.; R. L. M. TEEUWEN; M. H. A. JANSSEN; R. A. SHELDON; P. J. DUNN; R. M. HOWARD; R. KUMAR; I. MARTINEZ; J. W. WONG. *Pseudomonas stutzeri* lipase: a useful biocatalyst for aminolysis reactions. **Green Chemistry**, v. 13, n. 7, p. 1791-1798, 2011.

VILLENEUVE, P.; MUDERRHWA, J.M.; GRAILLE, J., HAAS, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.9, p. 113-148, 2000.

VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 6, p. 515-536, 2007.

VITOLO, M., Imobilização de enzimas, In: LIMA, U. A., AQUARONE, E.; BORZANI, W. SCHIMIDELL, W., (eds), Biotecnologia Industrial, **Processos Fermentativos e Enzimáticos**, v. 3, pp. 391-404, 2001.

WAHAB, R. A.; M. BASRI; M. B. A. RAHMAN; R. RAHMAN; A. SALLEH; T. C. LEOW. Combination of Oxyanion Gln114 Mutation and Medium Engineering to Influence the Enantioselectivity of Thermophilic Lipase from *Geobacillus zalihae*. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 13, n. 9, p. 11666-11680, 2012.

WANG, J. X.; HUANG, Q. D.; HUANG, F. H.; WANG, J. W.; HUANG, Q. J. Lipase-catalyzed Production of Biodiesel from High Acid Value Waste Oil Using Ultrasonic Assistant. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 1121-1128, 2007.

WANG, K.; G. LI; S. Q. YU; C. T. ZHANG; Y. H. A. LIU. A novel metagenome-derived beta-galactosidase: gene cloning, overexpression, purification and characterization. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 88, n. 1, p. 155-165, 2010.

WANG, Y.; WU, H.; ZONG, M. H. Improvement of biodiesel production by lipozyme TL IM-catalyzed methanolysis using response surface methodology and acyl migration enhancer. **Bioresource Technology**, 2008.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, n. 4, p. 355-360, 2000.

WISDOM, R. A.; P. DUNNILL; M. D. LILLY; A. MACRAE. Enzymic interesterification of fats: Factors influencing the choice of support for immobilized lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 6, n. 10, p. 443-446, 1984.

WU, J.C.; LEE, S.S.; MAHMOOD, M.M.B.; CHOW, Y.; TALUKDER, M.M.R.; CHOI, W.J. Enhanced activity and stability of immobilized lipases by treatment with polar solvents prior to lyophilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45 p. 108–112, 2007.

WU, J. C.; SONG, B. D.; XING, A. H.; HAYASHI, Y.; TALUKDER, M. M. R.; WANG, S. C. Esterification reactions catalyzed by surfactant-coated *Candida rugosa* lipase in organic solvents. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 11, p. 1229-1233, 2002.

WU, X. P.; P. Y. YOU; E. Z. SU; J. J. XU; B. GAO; D. Z. WEI. In vivo functional expression of a screened *P. aeruginosa* chaperone-dependent lipase in *E. coli*. **Bmc Biotechnology**, v. 12, n. p. 2012.

YADAV, G. D.; JADHAV, S. R. Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: Transesterification in non-aqueous medium. **Microsporous Mesoporous Materials**, v.86, n.1-3, p. 215-222, 2005.

YADAV, G. D.; DHOOT, S. B. Immobilized lipase-catalysed synthesis of cinnamyl laurate in non-aqueous media. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 57, n. 1-4, p.34-39, 2009.

YANG, C. F.; WANG, F. H.; LAN, D. M.; WHITELEY, C.; YANG, B.; AND WANG, Y. H. Effects of organic solvents on activity and conformation of recombinant *Candida antarctica* lipase A produced by *Pichia pastoris*. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 533-537, 2012.

YANG, J. H.; K. KOBAYASHI; Y. IWASAKI; H. NAKANO; T. YAMANE. In vitro analysis of roles of a disulfide bridge and a calcium binding site in activation of *Pseudomonas* sp strain KWI-56 lipase. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 2, p. 295-302, 2000

YE, P.; XU, Z. K.; WANG, Z. G.; WU, J.; DENG, H. T.; SETA, P. Comparison of hydrolytic activities in aqueous and organic media for lipases immobilized on poly(acrylonitrile-co-maleic acid) ultrafiltration hollow fiber membrane. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 32, n. 4, p. 115-121, 2005.

YESILOGLU, Y. Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 81, n. 2, p. 157-160, 2004.

XIE, W.; N. MA. Enzymatic transesterification of soybean oil by using immobilized lipase on magnetic nano-particles. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 6, p. 890-896, 2010.

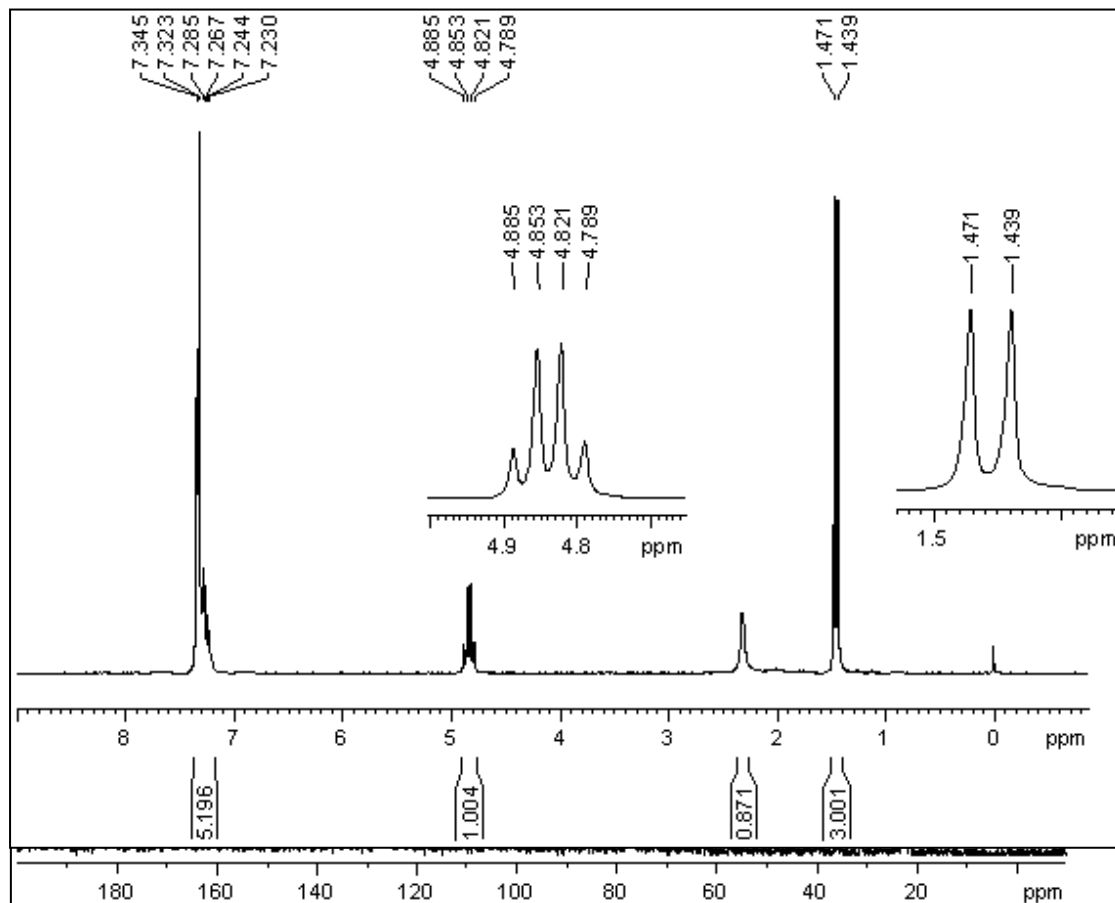
ZAKS, A.; KLIBANOV, M.A. The effect of water on enzyme action in organic media. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 263, n. 17, n. 15, p. 8017-8021,1998.

ZHENG, X. M.; WU, N. F.; FAN, Y. L. Characterization of a novel lipase and its specific foldase from *Acinetobacter* sp XMZ-26. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 643-650, 2012.

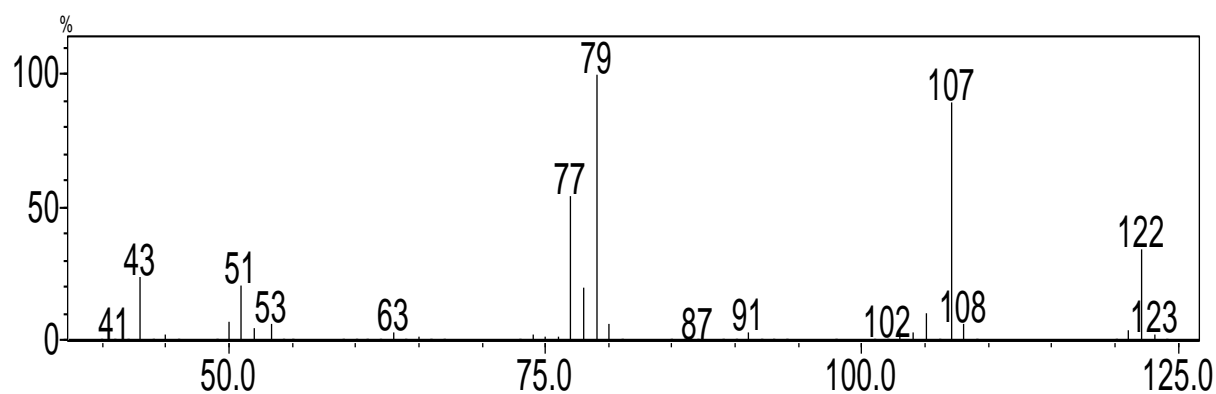
ZHENG, R.C.; LI, A.P.; WU, Z.M.; ZHENG, J.Y.; ZHENG, Y.G. Enzymatic production of (S)-3-cyano-5-methylhexanoic acid ethyl ester with high substrate loading by immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 23, n. 22–23, p. 1517-1521, 2012.

9 ANEXOS

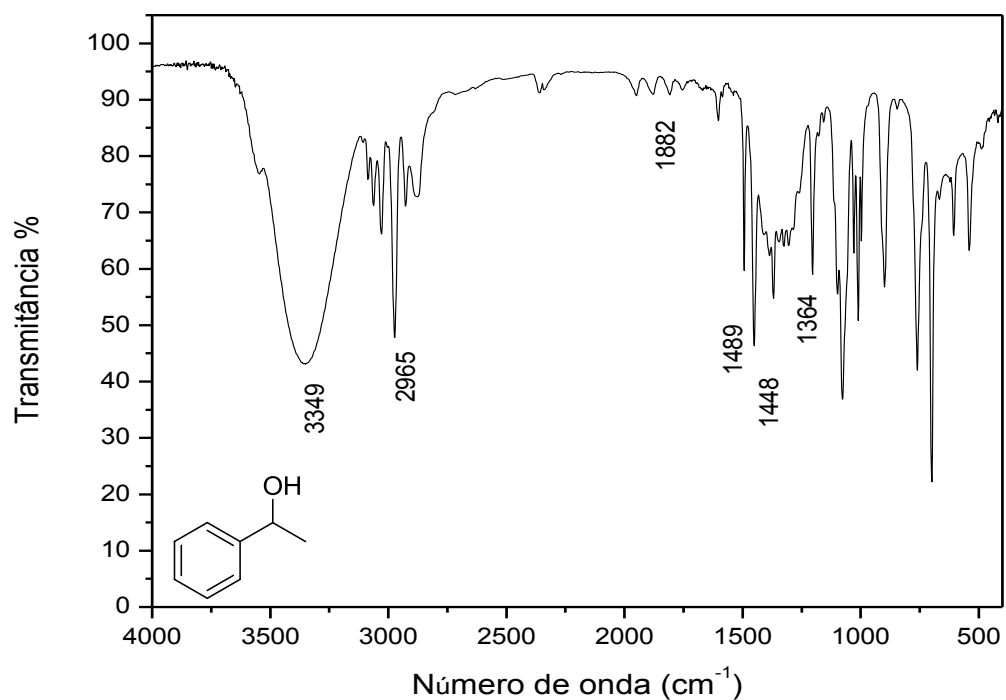
Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do álcool 1-fenil-1-etanol.



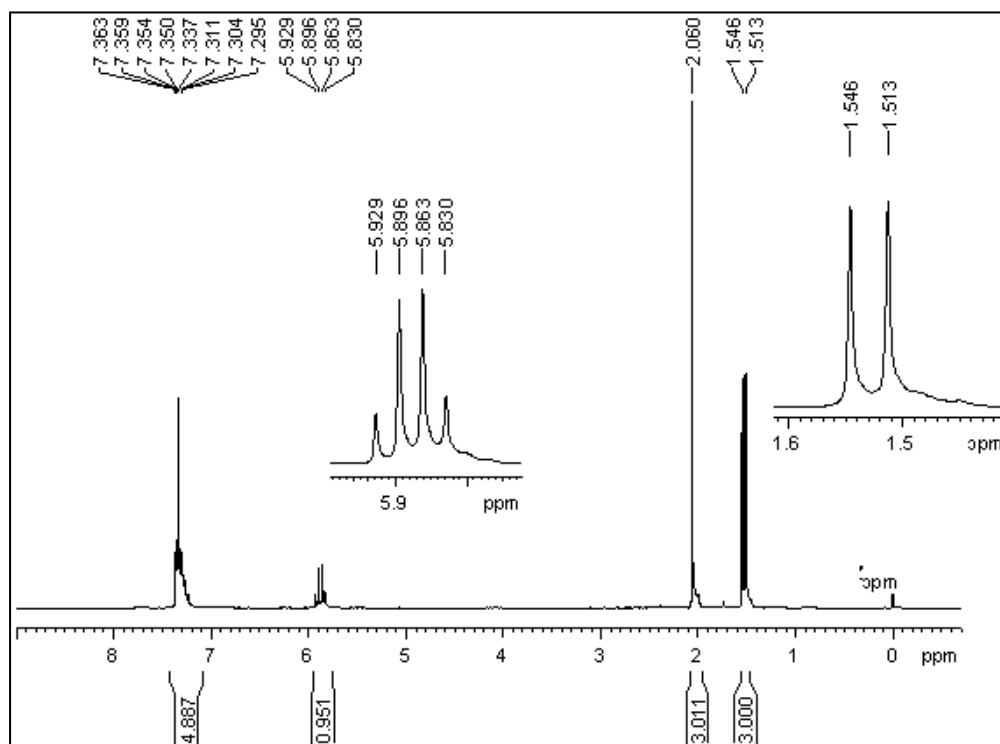
Espectro de MS do álcool 1-fenil-1-etanol.



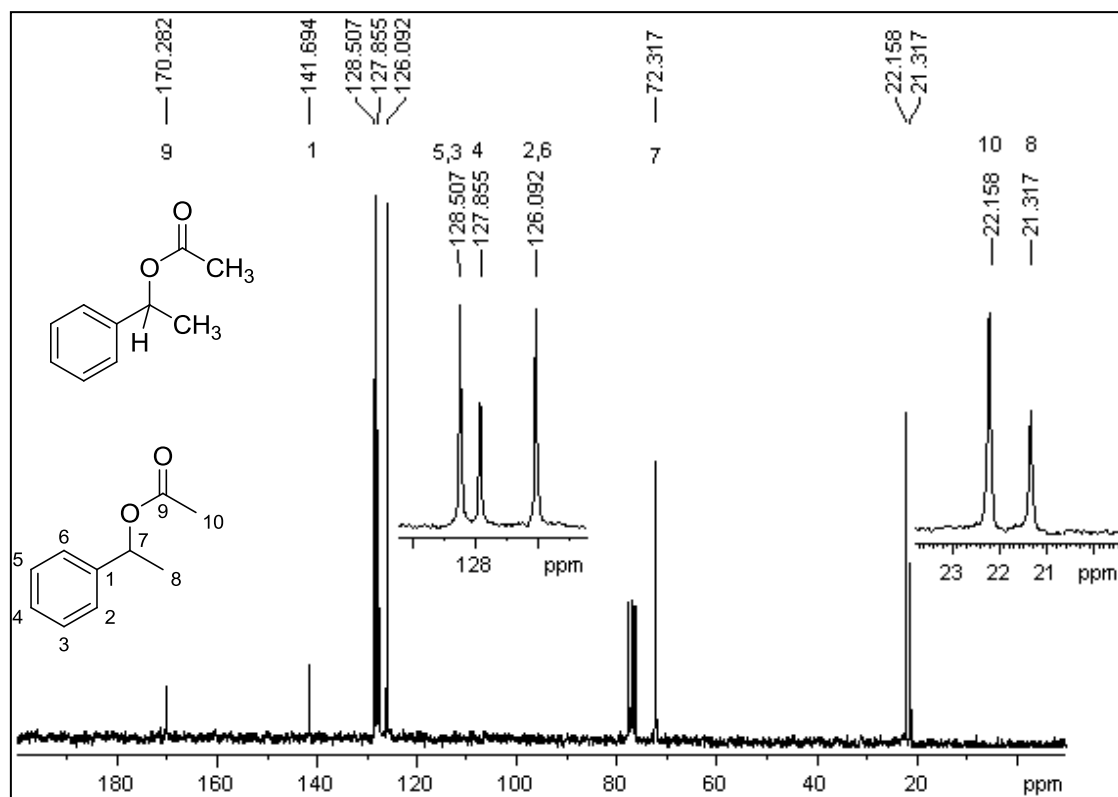
Espectro de FTIR do álcool 1-fenil-1-etanol.



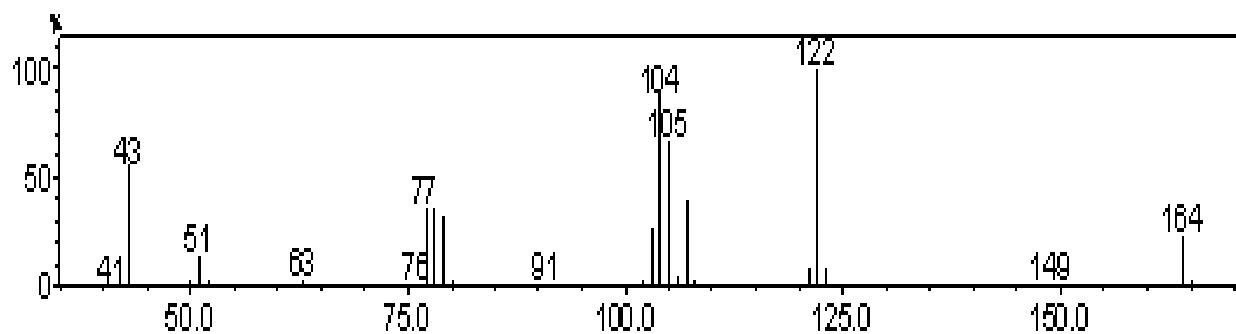
Espectro de RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) do éster acetato de 1-feniletila.



Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) do éster acetato de 1-feniletila.



Espectro de MS do éster acetato de 1-feniletila.



Espectro de FTIR do éster acetato de 1-feniletila.

